

**Die Wirkung von Interleukin-17A und Interferon- γ
auf die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 in
Neuronen der Hinterwurzelganglien**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Matthias Bernhard Erich Götze

geboren am 06. September 1993 in Gera

Gutachter

1. PD Dr. Gisela Segond von Banchet, Jena
2. apl. Prof. Dr. Rolf Bräuer, Jena
3. Prof. Dr. Karl Meßlinger, Erlangen

Tag der 3. ärztlichen Prüfung 14. Mai 2020

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04. Februar 2020

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Zusammenfassung	7
3	Einführung	9
3.1	Rheumatoide Arthritis	9
3.1.1	Allgemeines	9
3.1.2	Epidemiologie	10
3.1.3	Schmerzentsstehung in der rheumatoiden Arthritis	10
3.2	Der Transkriptionsfaktor STAT	14
3.2.1	Der Transkriptionsfaktor STAT3	16
3.2.2	Der Transkriptionsfaktor STAT1	17
3.2.3	Interaktionen zwischen STAT1 und STAT3	19
3.3	Ziel der Arbeit	21
4	Material und Methoden	23
4.1	Material	23
4.1.1	Rattenstämme	23
4.1.2	DRG-Paraffinschnitte der adulten Ratte mit Antigen-induzierter Arthritis (AIA)	23
4.1.3	Geräte	23
4.1.4	Reagenzien, Puffer und Kulturmedien	24
4.1.5	Antikörper und Zytokine	26
4.2	Methoden	27
4.2.1	Präparation einer adulten Ratte und DRG-Entnahme	27
4.2.2	Stimulation von kultivierten DRG-Neuronen der adulten Ratte	28
4.2.3	Antikörpermarkierung an kultivierten DRGs der adulten Ratte	29
4.2.4	Antikörpermarkierung an Paraffinschnitten der AIA-Ratte	30
4.2.5	Western Blot	31
4.2.6	Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie	32
4.2.7	Statistische Auswertung	33
5	Ergebnisse	34
5.1	Der Effekt von Interleukin-17A auf pSTAT3 in kultivierten DRG-Neuronen ...	34
5.2	Der Transkriptionsfaktor pSTAT1 in der AIA	37
5.3	Der Transkriptionsfaktor pSTAT3 in der AIA	39
5.4	Der Effekt von Zytokinen auf pSTAT3 und SOCS3 in DRG-Neuronen	41

5.4.1	Orientierende Vorversuche	41
5.4.2	Interferon- γ und SOCS3 in kultivierten Neuronen	44
5.4.3	Interferon- γ und pSTAT3 in kultivierten DRG-Neuronen.....	51
5.4.4	Interferon- γ und pSTAT3 im Western Blot	53
6	Diskussion	55
7	Schlussfolgerung und Ausblick	69
8	Literaturverzeichnis.....	71
9	Anhang.....	77
9.1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	77
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung	78
9.3	Danksagung	79

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ABC	avidin-biotin-peroxidase complex
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
anti-CCP	anti-cyclic citrullinated peptide
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD-Kamera	charge-coupled device-Kamera
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CIS	cytokine-inducible SH2 protein
cm	Zentimeter
CREB	cAMP response element-binding protein
DC	dendritische Zellen
DMEN	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DRG	dorsal root ganglion
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	extracellular-signal regulated kinases
g	Gramm
GAR	goat-anti-rabbit
Gp	Glycoprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	human leukocyte antigen
HRP	horseradish peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
K	Kontrolle oder Kelvin
KM	Hintergrundfluoreszenz
l	Liter
MAP-Kinase	mitogen-activated protein-Kinase
mBSA	methyliertes bovines Serumalbumin
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mol/l	Mol pro Liter
mRNA	messenger ribonucleic acid
ms	Millisekunden
N	Versuchszahl oder Häufigkeit
NF-kB	nuclear factor kappaB
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PIAS	protein inhibitors of activated STAT
pSTAT	phosphoryliertes STAT
PTP1B	protein tyrosine phosphatase 1B

PVDF.....	Polyvinylidendifluorid
RA	rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktoren
rpm	revolutions per minute
SDS.....	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error mean
SENP1	Sentrin/SUMO-specific protease 1
SF.....	Synovialfibroblasten
sIL-6R.....	löslicher Interleukin-6-Rezeptor
SOCS	suppressor of cytokine signalling
STAT	signal transducers and activators of transcription
TBS-T.....	Tris-buffered saline with Tween20
Th-Zellen	T-Helferzellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPV4.....	transient receptor potential vanilloid 4
V	Volt
ZNS	zentrales Nervensystem
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer

2 Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis ist eine häufige Autoimmunerkrankung, die unbehandelt zu schweren Gelenkdestruktionen führt. Für die Patienten sind neben den funktionellen Ausfällen vor allem die Schmerzen ein Problem. In der Pathogenese dieser Erkrankung spielen proinflammatorische Zytokine eine große Rolle. Diese können unter anderem in peripheren nozizeptiven Neuronen zu einer Sensibilisierung führen und so zur Entstehung chronischer Schmerzen und Hyperalgesie beitragen.

Die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 sind ein wichtiger Bestandteil in der Signalweiterleitung von Zytokinen auf zellulärer Ebene. Sie sind auch an der Genese der rheumatoiden Arthritis beteiligt. Unabhängig von dieser Erkrankung gibt es einen Zusammenhang zwischen STAT3 und der Entwicklung chronischer Schmerzen. Des Weiteren wurden in der Literatur wiederholt Interaktionen zwischen STAT1 und STAT3 beschrieben. Es wurde die These abgeleitet, dass die Sensibilisierung peripherer nozizeptiver Neurone infolge arthritischer Vorgänge durch proinflammatorische Zytokine zum Teil über STAT1 und STAT3 vermittelt werden kann.

Darauf aufbauend wurde in der Antigen-induzierten Arthritis - ein etabliertes Tiermodell für die rheumatoide Arthritis - die Aktivierung von STAT1 und STAT3 in peripheren nozizeptiven Neuronen der Ratte untersucht. Ebenso wurden Stimulationen mit Interleukin-17A, Interleukin-6 und Interferon- γ an jenen Neuronen gesunder Ratten durchgeführt und deren Einfluss auf STAT3 und SOCS3, das einen negativen Feedback-Mechanismus zu STAT3 bildet, beschrieben.

Es wurden im Rahmen der Antigen-induzierten Arthritis Paraffinschnitte verwendet. Ansonsten kamen Methoden der Zellkultur und der Immunhistochemie zum Einsatz. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Auflicht- und Fluoreszenzmikroskopie. Ergänzend wurden Ergebnisse aus Western Blots hinzugezogen.

Im Verlauf der Antigen-induzierten Arthritis wurde STAT1 stark herunterreguliert, während kein Effekt auf STAT3 beschrieben werden konnte. In der Zellkultur hingegen konnte Interleukin-17A STAT3 aktivieren. Eine Interferon- γ -Zugabe zeigte einen positiven Effekt auf SOCS3, aber nicht auf STAT3. Die anderen beiden Zytokine hatten keinen nennenswerten Effekt auf SOCS3.

Bisher gibt es vor allem Arbeiten, die diese Transkriptionsfaktoren in der Gelenkschleimhaut und in Immunzellen im Zusammenhang mit Arthritis erforschten.

Deren Verhalten und Rolle in peripheren nozizeptiven Neuronen wurde bisher nicht hinreichend untersucht. Diese Arbeit leistet hier einen Beitrag und konnte zeigen, dass in der Antigen-induzierten Arthritis das untersuchte STAT1 langfristig beeinflusst werden kann. Warum STAT3 in dem Modell unverändert blieb, konnte nicht abschließend geklärt werden, zumal Stimulationen mit den Zytokinen Interleukin 17A oder Interleukin-6 jenes hochregulieren können und ebendiese Zytokine spielen auch in der Antigen-induzierten Arthritis eine wichtige Rolle. Es ist theoretisch denkbar, dass eine kurze STAT3-Aktivierung zwischen den definierten Zeitpunkten der Schnittserien liegt und diese so maskiert wird. Eine andere Möglichkeit wäre eine schnelle Hochregulation von SOCS3. Interferon- γ konnte in dieser Arbeit als SOCS3-Induktor festgestellt werden. Interferon- γ könnte in peripheren nozizeptiven Neuronen eine Art Gegenspieler zu Interleukin-6 und -17A sein.

Weiterführend wäre die Untersuchung des Verhaltens von SOCS3 und gegebenenfalls SOCS1 in der Antigen-induzierten Arthritis eine interessante Fortführung dieser Ergebnisse. Auf diese Weise könnten Interaktionen zwischen STAT1 und STAT3 über SOCS1 und SOCS3 besser eingeordnet werden.

3 Einführung

3.1 Rheumatoide Arthritis

3.1.1 Allgemeines

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische Autoimmunerkrankung. Sie ist vor allem durch eine chronische Entzündung der Gelenke sowie Destruktion des Knorpels und der Knochen gekennzeichnet. Die RA wird auch als chronische Polyarthritits bezeichnet. Überwiegend sind die Finger-, Hand- und Fußgelenke betroffen. Extraartikuläre Manifestationen wie zum Beispiel Rheumaknoten, Vaskulitis und ein entzündlicher Befall von Sehnenscheiden, Schleimbeuteln, innerer Organe und Augen können zu zusätzlichen Behinderungen des Patienten führen (Miehle 1999, Paulin et al. 2018). Die Ursache der Erkrankung ist bisher unbekannt, und es gibt keine Therapie, die zur Heilung führt. Eine medikamentöse Behandlung kann die Progression der Gelenkzerstörung lediglich verlangsamen (Huscher et al. 2015).

Die Gelenke sind von einer bindegewebigen Schicht, der Synovialmembran, umgeben. Gelangt nun das noch unbekannte Antigen über das Blut in die Synovialis, wird es von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und über den Haupthistokompatibilitätskomplex-II („major histocompatibility complex“, MHC) den T-Lymphozyten präsentiert. Passende T-Helferzellen werden aktiviert, teilen sich und bringen eine Entzündungsreaktion in Gang, indem sie Monozyten und Makrophagen rekrutieren. Diese schütten eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine aus wie zum Beispiel den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin (IL)-1 β , die weitere Entzündungszellen, Synovialzellen und Osteoklasten aktivieren, sodass es zu einer Kaskade des Entzündungsprozesses kommt (Bernhard und Villinger 2001). Außerdem werden auch B-Lymphozyten aktiviert, die Antikörper gegen körpereigene Stoffe bilden können (Rheumafaktoren, RF; „anti-cyclic citrullinated peptide“, anti-CCP (Mageed et al. 1997, Baeten et al. 2001)). Im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung eines Pannus, einer synovialen Zellvermehrung oder Hyperplasie. Diese aggressive Zellwucherung infiltriert den Knorpel und den Knochen (Miehle 1999).

Die chronische Schmerzhaftigkeit der Gelenke wird möglicherweise zum Teil durch den Druck des entstehenden Pannusgewebes verursacht, der auf nervenreiche Strukturen wie die Synovialmembran und das Periost drückt. Zudem werden durch die zahlreich ausgeschütteten Entzündungsmediatoren die Endigungen der Nozizeptoren sensibilisiert (Pinho-Ribeiro et al. 2017).

3.1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz der rheumatoiden Arthritis (RA) liegt in Deutschland bei ca. 0,5-1%. Weltweit ist die Prävalenz ähnlich hoch. Hierzulande sind etwa 800 000 Menschen an der RA erkrankt, wobei die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung mit dem Alter zunimmt (Miehle 1999, Clark et al. 2004). Der Erkrankungsgipfel befindet sich zwischen dem 55. Und 75. Lebensjahr. Frauen sind etwa 2- bis 3-mal häufiger betroffen als Männer, wobei Frauen auch deutlich früher erkranken. Der MHC-I, beim Menschen HLA („human leukocyte antigen“) genannt, wird von allen kernhaltigen Zellen getragen und weist einen großen Polymorphismus auf. Patienten mit RA tragen zu 70% das HLA-Allel DR4/DRB1. Bei Gesunden kommt dieses nur zu 25% vor. Dies spricht für eine gewisse genetische Disposition (Herold 2016).

3.1.3 Schmerzentstehung in der rheumatoiden Arthritis

Die Schmerzen sind für die Betroffenen das am schwersten zu ertragende Hauptsymptom der RA. Sie verursachen sekundär psychischen Distress und Schlafstörungen, was sich wiederum negativ auf die Lebensqualität auswirkt (Heiberg und Kvien 2002, Minnock et al. 2003).

Potentiell gewebsschädigende Reize werden von sogenannten Nozizeptoren wahrgenommen. Das sind perlschnurartig aufgetriebene Nervenendigungen, die zur Gruppe der A δ - und C-Fasern gehören, deren Somata in den Hinterhornganglien liegen („dorsal root ganglion“, DRG). Auf den Nozizeptoren befinden sich Ionenkanäle und Rezeptoren, die durch Schmerzreize geöffnet oder durch Mediatoren aktiviert werden können. Die Somata selbst tragen auch diese Ionenkanäle und Rezeptoren. Deshalb können sie stellvertretend als sensorische Endigung im Tiermodell genutzt werden (McCleskey und Gold 1999, Schaible und Grubb 1993). Umgeschaltet werden die Axone der DRG-Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks. Von dort kreuzt die Schmerzbahn auf die Gegenseite des Rückenmarks und steigt im Tractus spinothalamicus zentralwärts zum Thalamus auf. Dort werden die Schmerzreize weitergeleitet und verarbeitet. Gleichzeitig gibt es vom Gehirn ausgehend eine schmerzhemmende, absteigende Bahn, die die Schmerzwahrnehmung beeinflusst (Yam et al. 2018).

Schmerzen können in akute und chronische Schmerzen eingeteilt werden. Akute Schmerzen können von Sekunden bis hin zu Wochen und Monaten andauern. Chronische Schmerzen dauern per Definition länger als 3 Monate, entweder weil der

Schmerzstimulus weiterhin anhält, oder aber Umbauprozesse im Nervensystem begonnen haben. Diese sorgen dafür, dass das gesamte System verändert wird, was auch zentrale Sensibilisierung genannt wird (Lee et al. 2011).

Die RA ist von peripherer und zentraler Sensibilisierung geprägt. Es kommt zu Spontanschmerzen, Schmerzen nach einem nicht schmerzhaften Reiz (Allodynie) und verstärktem Schmerzempfinden (Hyperalgesie). Schmerzreize können mechanisch, chemisch und thermisch, aber auch durch Inflammation ausgelöst werden. Diese Reize führen dazu, dass Ionenkanäle am Nozizeptor geöffnet werden und Aktionspotentiale entstehen können, die zentralwärts weitergeleitet werden. Die Nozizeptoren können sensibilisieren, woraufhin sie schon bei niederschwelligen, nicht-schmerzvollen Reizen aktiviert werden können. Man nennt dies periphere Sensibilisierung und sie führt zur Hyperalgesie. Verantwortlich dafür sind Mediatoren wie Bradykinin, Leukotriene, Zytokine, Prostaglandin E₂ und Histamin (**Abbildung 1**). Die meisten dieser Mediatoren wirken über metabotrope Rezeptoren auf „second messenger“ Systeme, die zu einer leichteren Öffnung der Ionenkanäle führen (Schaible et al. 2002, Pinho-Ribeiro et al. 2017). Neuropeptide wie die Substanz P oder „calcitonin gene-related peptide“ (CGRP) werden von den nozizeptiven DRG-Neuronen selbst gebildet und bei Aktivierung ausgeschüttet (Schaible et al. 2002). Sie können ihrerseits ebenfalls zur peripheren und zentralen Sensibilisierung beitragen.

Für die zentrale Sensibilisierung spielt die Reizweiterleitung im Rückenmark eine größere Rolle. Präsynaptisch wird bei Erregung Glutamat freigesetzt. Dieses aktiviert postsynaptisch „ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid“ (AMPA)- und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren. Während die AMPA-Rezeptoren leicht zu aktivieren sind, brauchen die NMDA-Rezeptoren zusätzlich eine starke postsynaptische Depolarisation. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren spielt eine wesentliche Rolle in der neuronalen Plastizität und damit auch für die zentrale Sensibilisierung und Übererregbarkeit in der RA (Neugebauer et al. 1993). Auch sind nicht-neuronale Zellen an der Entstehung chronischer, neuropathischer Schmerzen beteiligt. So wird der Mikroglia im Hinterhorn des Rückenmarks, das sind Gewebsmakrophagen des zentralen Nervensystems (ZNS), eine bedeutende Rolle in der Entstehung neuropathischer Schmerzen und taktiler Allodynie zugesprochen (Tsuda et al. 2009).

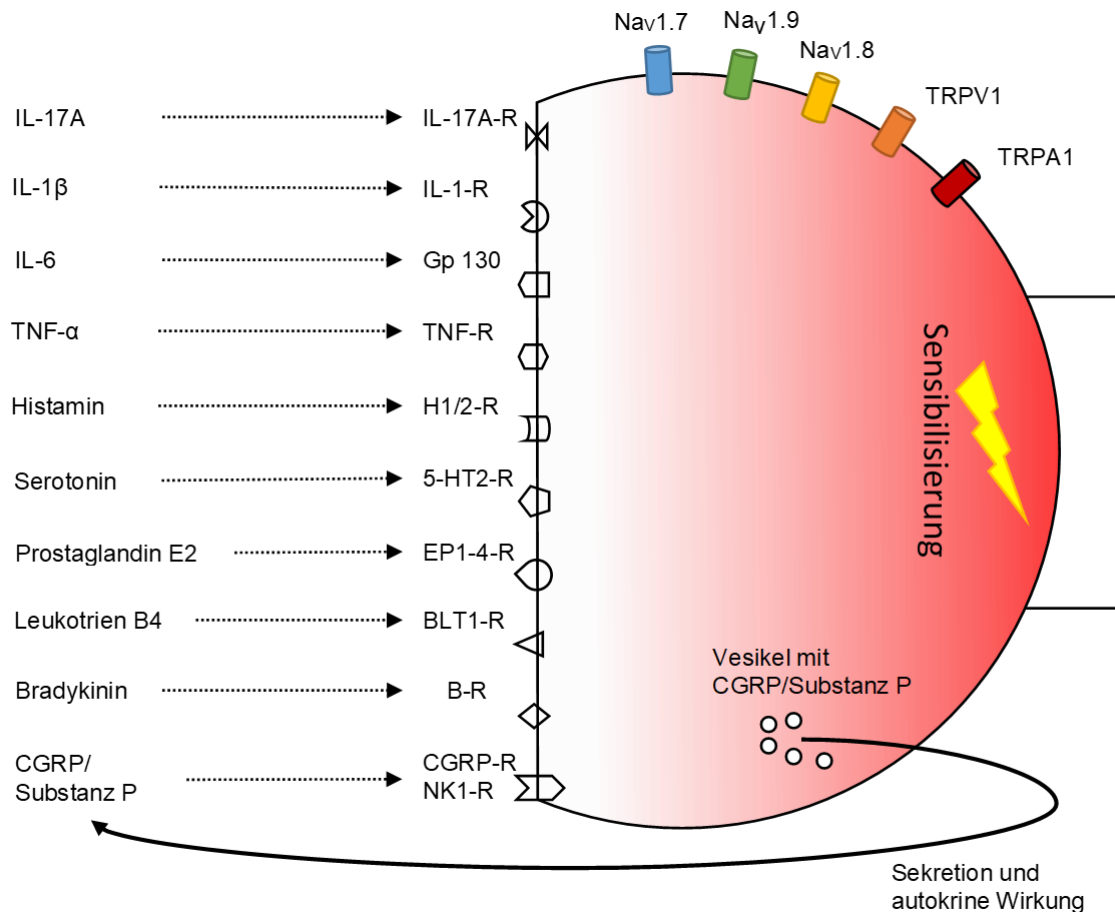


Abbildung 1 Schematische Darstellung einer nozizeptiven Endigung. Es sind relevante Schmerzmediatoren, die zur Sensibilisierung eines peripheren nozizeptiven Neurons beitragen können, dargestellt (links). Die Rezeptoren (R) für diese Schmerzmediatoren befinden sich in der Nozizeptormembran (Mitte). Die Ionenkanäle, die auf innere und äußere Reize mit Ionenströmen reagieren, sorgen dafür, dass ein Aktionspotential gebildet werden kann (rechts/oben). Diese Kanäle können durch Phosphorylierungen in ihrer Aktivität reguliert werden. Die Ionenkanäle $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ und $Na_v1.9$ sind spannungsgesteuerte Natriumkanäle. TRPV1 und TRPA1 (TRP, „transient receptor potential“) sind ligandengesteuerte Ionenkanäle. Der TRPV1-Kanal wird typischerweise durch Capsaicin und hohe thermische Reize geöffnet. TRPA1 wird durch mechanische und weitere chemische Stimuli geöffnet. Die Neuropeptide Substanz P und CGRP können vom Neuron selbst gebildet und sezerniert werden. Diese können autokrin auf den Nozizeptor selbst wirken und so zur Sensibilisierung beitragen. Variiert nach Schaible et al. 2002, Pinho-Ribeiro et al. 2017.

Zytokine spielen in der Entstehung der RA eine große Rolle. Zytokine sind Botenstoffe, die unter anderem Wachstums- und Differenzierungsprozesse steuern und immunmodulatorisch wirken. In der RA werden sie vor allem von Immunzellen wie $CD4^+$ T-Helferzellen (Th-Zellen), Makrophagen, dendritischen Zellen (DC), B-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Synovialfibroblasten (SF) in der Gelenkschleimhaut produziert. Zytokine können auch auf Nozizeptoren wirken und spielen somit eine Rolle bei der Entzündung und der Schmerzentstehung in der RA.

Typische Vertreter der Zytokine sind TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-17A. Es finden sich Rezeptoren für diese Zytokine auf der Oberfläche von DRG-Neuronen. Untersuchungen zeigen, dass Medikamente, die gegen diese Zytokine und deren Rezeptoren gerichtet sind, die Entzündung, aber auch das Schmerzempfinden zum Teil unabhängig von der Entzündung reduzieren können (Ebbinghaus et al. 2017, Sommer und Kress 2004, Schaible et al. 2010).

In dieser Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf IL-17A, Interferon (IFN)- γ und IL-6 gerichtet und deren Einfluss auf die DRG-Neurone in der RA. IL-17A wird von Th-17-Zellen und weiteren Immunzellen gebildet und kann unter anderem SF aktivieren, den Knochenabbau über die Aktivierung von Osteoklasten fördern und chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken (Lubberts et al. 2002). Des Weiteren kann es die Ausschüttung zahlreicher weiterer proinflammatorischer Zytokine von Makrophagen bewirken und die Autoantikörperproduktion von B-Zellen induzieren (Hickman-Brecks et al. 2011, Jovanovic et al. 1998). Die IL-17A-Konzentration ist bei der RA erhöht und korreliert mit der Erkrankungsaktivität. Die Rolle von IL-17A in der RA ist aber noch nicht endgültig verstanden. Zum einen gibt es eindeutige Hinweise, dass IL-17A stark in die Pathogenese der RA eingebunden ist, zum anderen brachten klinische Tests eines selektiven IL-17A-Antagonisten (Secukinumab) nur mäßige klinische Erfolge (Blanco et al. 2017, van Baarsen et al. 2014).

Nichtsdestotrotz spielt IL-17A in der Nozizeption eine wichtige Rolle. Auf DRG-Neuronen kommen IL-17A-Rezeptoren vor. Das lässt darauf schließen, dass IL-17A direkt auf nozizeptive Neurone wirken kann. Im Tiermodell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) konnte nachgewiesen werden, dass IL-17A die Erregbarkeit von DRG-Neuronen erhöht und bei der Entstehung von mechanischer Hyperalgesie maßgeblich beteiligt ist. Dieser Effekt könnte darauf beruhen, dass IL-17A in die Sekretion von CGRP mit eingreift und die Rezeptordichte von TRPV4 („transient receptor potential vanilloid“) in den Zellmembranen erhöht. TRPV4 ist ein Ionenkanal, der mit mechanischer Hyperalgesie im Zusammenhang steht. Allerdings scheint IL-17A einen geringen Einfluss auf die Schwere und den Verlauf der AIA zu haben (Richter et al. 2012, Ebbinghaus et al. 2017, Segond von Banchet et al. 2013).

IL-6 spielt in der RA ebenfalls eine große Rolle. In der Synovia, das ist die Gelenkflüssigkeit, und im Blutplasma sind erhöhte Konzentrationen nachweisbar. Das Gleiche gilt für den löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R) (Uson et al. 1997).

Dieser kann in löslicher oder membrangebundener Form vorliegen. Neben vielen anderen Körperzellen tragen die meisten DRG-Neurone als Rezeptoruntereinheit das Glycoprotein (Gp) 130. Ein Komplex aus IL-6/sIL-6R aktiviert über dieses Glycoprotein den JAK-STAT3-Signalweg (JAK1, JAK2 und Tyrosinkinase 2) und den MAP-Kinase-Weg. Das führt zur Transkription bestimmter Zielgene im Zellkern (Hunter und Jones 2015). IL-6 hat neben seinen proinflammatorischen Effekten auch direkten Einfluss auf die Nozizeption durch Sensibilisierung. Das zeigten Untersuchungen an Nervenfaserableitungen und eine Erhöhung der Rezeptorendichte für die Substanz P in der DRG-Kultur nach IL6-Stimulation (Schaible et al. 2010). Auch kann IL-6 die Freisetzung von CGRP verstärken (Ebbinghaus et al. 2015).

INF- γ besitzt neben antiviralen auch immunmodulierende Eigenschaften. Es wird vorwiegend von Th1-Zellen gebildet. Der IFN- γ -Rezeptor besteht aus 2 Subtypen, von denen je zwei den IFN- γ -Rezeptor-Komplex bilden. Wenn dieser IFN- γ bindet, wird der JAK1/2-STAT1-Signalweg aktiviert, welcher zur Hochregulation von pSTAT1 führt. Die Rolle von IFN- γ ist nicht abschließend geklärt. Neben proinflammatorischen Effekten wie Makrophagenaktivierung, eine verstärkte Expression von MHC-II-Molekülen auf diversen Zellen und Auswirkungen auf Immunglobuline, zeigen sich auch antientzündliche Effekte (Page et al. 2010). Neuere Erkenntnisse in Tiermodellen zeigen ebenfalls protektive Effekte in der RA (Kirkham et al. 2006). Die Inflammation in der AIA verläuft in Abwesenheit von IFN- γ wesentlich schwerer und es kommt zu einer prominenten Erhöhung von IL-17A. IFN- γ kann deshalb in der AIA als ein Gegenspieler von IL-17A verstanden werden (Irmmler et al. 2007). IFN- γ kann im Hinterhorn des Rückenmarks Mikroglia aktivieren, was zur Ausbildung neuropathischer Schmerzen beiträgt (Tsuda et al. 2009).

3.2 Der Transkriptionsfaktor STAT

„Signal transducers and activators of transcription“ (STAT) sind Transkriptionsfaktoren und bilden eine Proteinfamilie, zu der STAT1 bis 6 gehören. STAT5 wird in STAT5A und STAT5B unterteilt. Die STATs werden rezeptor-assoziiert von Kinasen in Abhängigkeit von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren phosphoryliert und damit aktiviert. Zytokinrezeptoren besitzen keine eigene Enzymaktivität. Deshalb nutzen sie Janus-Kinasen (JAK). Zu den JAK gehören JAK1 bis 3 und die Tyrosinkinase 2 (Liongue und Ward 2013, Zhong et al. 1994).

Wenn ein Zytokin sich an seinen Rezeptor bindet, phosphoryliert JAK die Untereinheiten des Rezeptors. Das wiederum sorgt dafür, dass sich zwei STAT-Moleküle an den Rezeptor binden und auch von JAK phosphoryliert werden. Nun bildet das phosphorylierte STAT (pSTAT) einen Dimer und kann in den Zellkern zur Desoxyribonukleinsäure (DNS) gelangen, wo es seine Funktion als Transkriptionsaktivator ausübt (**Abbildung 2**). Dabei können Homodimere eines STAT-Typs entstehen, aber auch Heterodimere, wie zum Beispiel STAT1 und STAT3. Es gibt Hinweise, dass STATs, zum Beispiel STAT5, auch Tetramere bilden können, indem zwei Dimere dimerisieren (Mandal et al. 2011, Mao et al. 2005).

Negative Regulationsmechanismen sorgen dafür, dass STAT nicht unbegrenzt aktiviert werden kann. Zum einen gibt es Proteine, die dafür sorgen, dass die katalytische Aktivität der JAK reduziert und damit weniger STAT phosphoryliert wird, zum anderen gibt es „protein inhibitors of activated STAT“ (PIAS), die die pSTAT-DNS-Interaktion verhindern (Chung et al. 1997a).

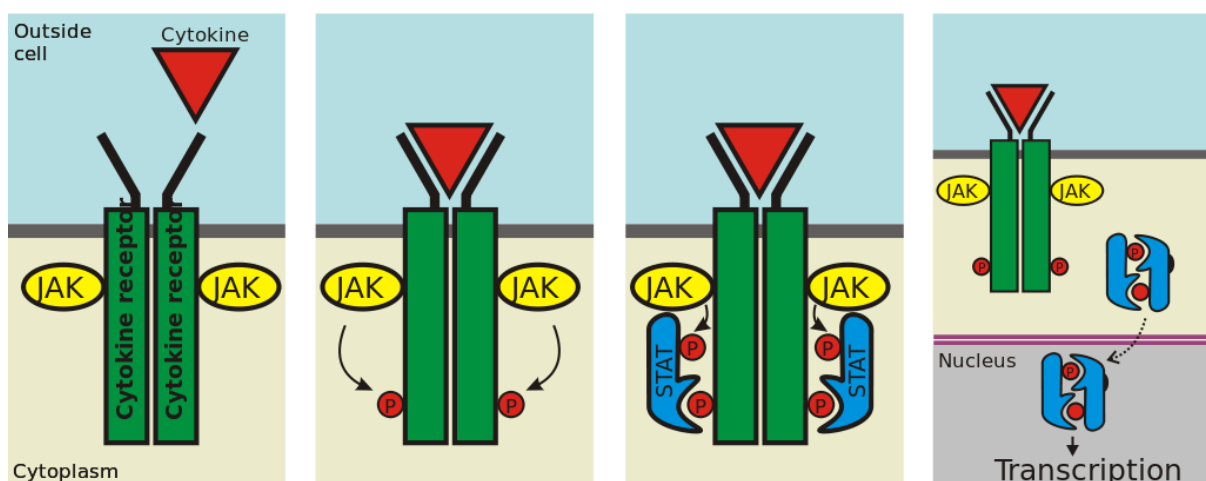


Abbildung 2 JAK-STAT-Signalweg. Dargestellt ist in vereinfachter Form ein Modell des JAK-STAT-Signalwegs. Nach der Bindung eines Zytokins an seinen Rezeptor phosphorylieren die Januskinasen die STAT-Proteine. Nach deren Dimerisierung und Einwanderung in den Zellkern können sie Transkriptionsprozesse initiieren.

Eine dritte Gruppe bilden die „suppressors of cytokine signalling“ (SOCS). Dazu gehören SOCS1 bis 7 und das „cytokine-inducible SH2 protein“ (CIS). Sie unterdrücken den JAK-STAT-Signalweg an verschiedenen Punkten. Sie können die aktive Domäne der JAK besetzen und auch den Zytokinrezeptor selbst als Wirkort haben und damit zu einer Reduktion der STAT-Phosphorylierung führen. Die SOCS kommen in niedriger Konzentration in vielen Geweben vor und werden durch Zytokine und damit durch die Aktivierung von STAT induziert. Die SOCS bilden also einen

klassischen negativen Feedback-Mechanismus (Larsen und Ropke 2002). Des Weiteren sind Hinweise bekannt, dass die SOCS zum Beispiel in neutrophilen Granulozyten auch unabhängig von STAT durch Zytokine induziert werden können (Cassatella et al. 1999).

3.2.1 Der Transkriptionsfaktor STAT3

In dieser Arbeit wird auf die Proteine STAT3 und STAT1 genauer eingegangen. STAT3 kann mit weiteren Transkriptionsfaktoren aus der STAT-Proteinfamilie, wie zum Beispiel mit STAT5 interagieren (Zheng et al. 2015). Es sind auch Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B („nuclear factor kappaB“) bekannt. NF- κ B wirkt antiapoptotisch und kann Onkogene aktivieren. Eine dauerhafte STAT3-Aktivierung unterstützt NF- κ B in seiner antiapoptotischen Wirkung (Lee et al. 2009).

STAT3 spielt eine große Rolle in vielen zellulären Prozessen und wirkt positiv auf Zellwachstum und Apoptose (Jackson und Ceresa 2017). In Tumorgewebe konnte wiederholt eine pSTAT3-Überexpression durch somatische Mutationen nachgewiesen werden, und dies ist Gegenstand der Erforschung weiterer therapeutischer Möglichkeiten in der Tumorthherapie (Bixel et al. 2017, Li et al. 2018, Tong et al. 2017). Keimbahnmutationen, die zu einer verringerten STAT3-Aktivität führen, können zu einer erhöhten Infektionsneigung, zu Lymphomen und zum Hyper-IgE-Syndrom führen (Freeman und Holland 2008). Aktivierende STAT3-Keimbahnmutationen führen zu „early-onset“ Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel dem neonatalen Diabetes (Flanagan et al. 2014).

STAT3 zeigt in autoimmunen Prozessen Relevanz. Es ist an der Differenzierung von CD4⁺-Th-Zellen zu Th17-Zellen maßgeblich beteiligt. Hier ist IL-6 als STAT3-Hauptaktivator zu nennen (Azizi et al. 2013). Auf die Bedeutung von Th17-Zellen und dem von ihnen gebildeten IL-17A wurde bezüglich der RA in Pathogenese und Schmerzentstehung bereits hingewiesen (Vgl. 3.1.3). Passend dazu konnte gezeigt werden, dass Blockaden des JAK2-STAT3-Signalwegs zu einer Abschwächung einer RA führen können (Park et al. 2014). Baricitanib hemmt selektiv den JAK1- und JAK2-Signalweg und wird erfolgreich bei Nichtansprechen von RA-Patienten auf Methotrexat angewendet (Taylor et al. 2017).

Es gibt Hinweise, dass STAT3 auch direkt mit der Entstehung von chronischen und neuropathischen Schmerzen, sowie mechanischer Allodynie in Verbindung steht (Shen et al. 2018, Wang et al. 2014). In einem Modell für neuropathische Schmerzen

an Ratten konnte gezeigt werden, dass in nozizeptiven Hinterhornneuronen der JAK2-STAT3-Signalweg im Vergleich zur Kontrollgruppe stark aktiviert war. Neben pSTAT3 war auch SOCS3 erhöht. Bei Blockade dieses Signalweges blieben die Spiegel von pSTAT3 und SOCS3 niedrig, und die Tiere zeigten in der Verhaltensanalyse signifikant weniger Schmerzen. Dies deutet darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor pSTAT3 in Neuronen einen Beitrag zur Entwicklung chronischer Schmerzen leistet und der Inhibitor SOCS3 mit pSTAT3 interagiert (Xue et al. 2014). Auch im Zytoplasma von DRG-Neuronen konnte STAT3 nachgewiesen werden. Zudem gibt es eine Verbindung zwischen der Transkription der Chemokine CXCL12 und CX3CL1 und pSTAT3. Diese Chemokine werden auch mit chronischer Schmerzentstehung und mechanischer Allodynie in Verbindung gebracht (Li et al. 2017, Shen et al. 2018, Stromberg et al. 2000).

3.2.2 Der Transkriptionsfaktor STAT1

Der Transkriptionsfaktor STAT1 kommt ubiquitär in Zellen der meisten Gewebe vor, wie zum Beispiel in Geweben mit hoher immunologischer Aktivität, wie in Milz und Lymphknoten, aber auch im Gehirn (Fagerberg et al. 2014). STAT1 kann mit anderen STAT-Proteinen und mit einer Vielzahl anderer Proteine wie zum Beispiel dem CREB („cAMP response element-binding protein“) -Bindeprotein, welches in Signalkaskaden vieler G-proteingekoppelter Rezeptoren ein Bindeglied darstellt, oder BRCA1 („breast cancer“), dessen Mutation zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Brustkrebs führt, interagieren (Li et al. 1996, Ouchi et al. 2000, Zhang et al. 1996).

Als typischer STAT1-Aktivator gilt IFN- γ . IFN- γ ist eng mit der JAK1 und der JAK2 assoziiert. Diese Kinasen phosphorylieren STAT1 zu pSTAT1. Dabei kann STAT1 an der Aminosäure Tyrosin 701 und am Serin 727 phosphoryliert werden. Das Serin wird aber durch eine Kinase des ERK („extracellular-signal regulated kinases“) - Signalwegs phosphoryliert. Auch sind weitere posttranslationale Modifikationen bekannt, die Einfluss auf die genaue Funktion von STAT1 haben (Stark und Darnell 2012, Herrera-Molina et al. 2012). Andere Zytokine wie IFN- α/β , IL-6 und IL-11 können ebenfalls über STAT1 wirken. Die Funktionen, die STAT1 ausüben kann, sind weit gestreut: STAT1 wirkt proapoptotisch. Es ist an der Abwehr von Infektionen beteiligt, da IFN- α und - β ihre antivirale Wirkung auch über STAT1 ausüben. IFN- γ vermittelt über STAT1 seine antibakterielle Wirkung (Chin et al. 1997, Dupuis et al. 2001, Wang et al. 2017, Zhao et al. 2016).

In der Tumorgenese wurde STAT1 durch seine antiapoptotische und wachstumshemmende Wirkung lange als rein tumorsuppressiv angesehen. Andere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass eine hohe und dauerhafte Expression von STAT1 auch zu erhöhter Widerstandsfähigkeit von Tumorzellen gegen Bestrahlung und Chemotherapeutika führen kann (Dunn et al. 2006, Khodarev et al. 2004, Rickardson et al. 2005).

Keimbahnmutationen von STAT1 sind sehr heterogen. Das führt zu sehr unterschiedlichen Ausprägungen. Mutationen, die zu einer verringerten STAT1-Aktivität führen, können die Anfälligkeit für virale Infektionen und Mykobakterien erhöhen. Mutationen, die zu einer Zunahme der STAT1-Aktivität führen, können ebenfalls zu chronischen Infektionen mit Mykobakterien führen. Auch wurde eine früh beginnende, kombinierte Immunschwäche mit Pilz- und CMV-Infektionen beschrieben. Auch viele Autoimmunerkrankungen gehen mit einer erhöhten STAT1-Aktivität einher (Banerjee et al. 2017, Baris et al. 2016).

Neben STAT3 und anderen STATs spielt auch STAT1 eine Rolle in der Pathogenese der RA. Es wurde eine Hochregulation und Aktivierung von STAT1 in Synovialfibroblasten, Makrophagen und anderen Leukozyten an inflammatorischer Gelenkschleimhaut beschrieben. Diese findet eher in der chronischen Phase der RA statt, während STAT3 zum Beispiel in der akuten und der chronischen Phase hochreguliert ist. In der Summe scheint STAT1 in der RA eher eine antiinflammatorische Rolle zu spielen. So zeigen sich in Tierexperimenten mit ausgeschaltetem STAT1-Gen, dass Gelenkzerstörung und Inflammation exazerbieren (de Hooge et al. 2004, Walker et al. 2006, Zhang et al. 2015).

STAT1 wird in der Forschung mit der Entstehung von chronischen und neuropathischen Schmerzen in Verbindung gebracht. Im Hinterhorn des Rückenmarks von Ratten konnte in einem Modell für Knochentumorschmerzen gezeigt werden, dass aktiviertes STAT1 in Mikroglia zur Rekrutierung von MHC-II-Molekülen führt. MHC-II wird meist mit Antigenpräsentation in Verbindung gebracht. Im Zusammenhang mit den Mikroglia konnte aber gezeigt werden, dass diese Moleküle auch mit der Entstehung von mechanischer Hyperalgesie in Zusammenhang gebracht werden können (Song et al. 2017, Sweitzer et al. 2002).

Auf Ebene der DRG-Neurone gibt es wenig Arbeiten, die den Transkriptionsfaktor STAT1 untersuchen. In fetalen DRG-Neuronen von Ratten wurde festgestellt, dass diese selbst IFN- γ sezernieren können. Dieses IFN- γ wirkt autokrin auf die entsprechenden Neurone und kann STAT1 aktivieren und so zur Regulation in der Entwicklung befindlicher sensorischer Neurone beitragen. Eine andere Arbeit zeigte in adulten Mäusen eine IFN- γ -Expression in Hinterhornneuronen des Rückenmarks und einen positiven Zusammenhang zwischen IFN- γ und der Entstehung neuropathischer Schmerzen (Neumann et al. 1997, Racz et al. 2008).

3.2.3 Interaktionen zwischen STAT1 und STAT3

STAT1 wie auch STAT3 können Homodimere bilden. Jedoch können auch beide STAT-Proteine zusammen dimerisieren und so Heterodimere bilden. In der Literatur wird häufig von gegensätzlichen Rollen von STAT1 und STAT3 berichtet (Hong et al. 2002, Stephanou et al. 2000, Wan et al. 2015). Beide STATs sind nicht nur funktionell gegensätzlich, sondern regulieren sich auch reziprok. Andererseits verhalten sich Zytokine, die als Hauptaktivator gelten, nicht zwangsläufig spezifisch. So kann IL-6, das als typischer STAT3-Aktivator gilt, auch in geringerem Maße pSTAT1 induzieren. Genauso kann IFN- γ neben seiner typischen STAT1-Aktivierung auch ein wenig pSTAT3 induzieren. Versuche mit dem gezielten Abschalten von Genen in Fibroblasten und Makrophagen zeigten, dass in STAT1-defizienten Zellen IFN- γ eine wesentlich höhere Aktivierung von STAT3 auslöst. In STAT3-defizienten Zellen kann IL-6 STAT1 stark hochregulieren. Auf diese Weise können auch Gene transkribiert werden, die eigentlich dem jeweils anderen Zytokin zugeschrieben werden (Costa-Pereira et al. 2002, Qing und Stark 2004, Kim et al. 2015, Hong et al. 2002).

Während anfangs nach der Entdeckung der Zytokine ihnen gerne stringente Funktionen zugeordnet wurden, wird heute immer mehr deutlich, dass Zytokine in verschiedenen Zellen und unter verschiedenen Ausgangssituationen andere und teils gegensätzliche Wirkungen erzielen können. In Betrachtung der STAT-Proteinfamilie ist dies ähnlich. Circa 60 Zytokine und Wachstumsfaktoren nutzen die JAK-STAT-Signalwege und können unterschiedliche Effekte erzielen, obwohl sie oft die gleichen STATs nutzen. Das proinflammatorische IL-6 kann wie das antiinflammatorische IL-10 und IL-27 STAT1 und STAT3 aktivieren und trotzdem unterschiedliche Zellantworten bewirken. IL-6 und IL-27 nutzen dabei sogar als gleiche Rezeptoruntereinheit Gp130 (Ivashkiv und Hu 2003, Pflanz et al. 2004).

Am Beispiel von IL-6 und IL-27 konnte gezeigt werden, dass diese Zytokine in CD4⁺Th-Zellen ein unterschiedliches Verhältnis von Homo- und Heterodimeren von STAT1 und STAT3 aufweisen. Während STAT3 für die hauptsächliche Transkriptionsleistung verantwortlich zu sein scheint, sorgt STAT1 eher für das spezifische Transkriptionsprofil. So sind viele der STAT1-DNS-Interaktionen auch STAT3-abhängig (Hirahara et al. 2015).

Neben dem Dimerisierungsmuster der STAT-Aktivierung spielt die Dauer der Aktivierung und negative Feedback-Mechanismen, beispielsweise durch SOCS, eine wichtige Rolle in der Herausbildung der letztlichen Wirkung eines Zytokins auf eine Effektorzelle (Hirahara et al. 2015, Whitmarsh et al. 2011). STAT1 induziert die Transkription von SOCS1 während STAT3 typischerweise mit SOCS3 in Verbindung gebracht wird (Alexander et al. 1999, Croker et al. 2003). Beide SOCS können die katalytische Aktivität der JAK2 herabsetzen. Nicht nur IL-6, sondern auch IFN- γ nutzen neben JAK1 auch JAK2. Des Weiteren kann SOCS3 die Aktivität von Gp130 und damit das IL-6-Signal herabsetzen (Larsen und Ropke 2002).

Ein weiterer negativer Feedback-Mechanismus zwischen STAT1 und STAT3 wurde in Makrophagen beschrieben. IFN- γ induziert über pSTAT1 das Protein SENP1 („Sentrin/SUMO-specific protease“). Dieses Protein reguliert die Phosphataseaktivität von PTP1B („protein tyrosine phosphatase“) und damit die Dephosphorylierung von pSTAT3 (Yu et al. 2017). Zur Verdeutlichung wurden die beschriebenen Mechanismen schematisch dargestellt (**Abbildung 3**). Es sind eine Vielzahl weiterer Interaktionsmöglichkeiten auf Ebene posttranslationaler Modifikationen denkbar und auch wahrscheinlich.

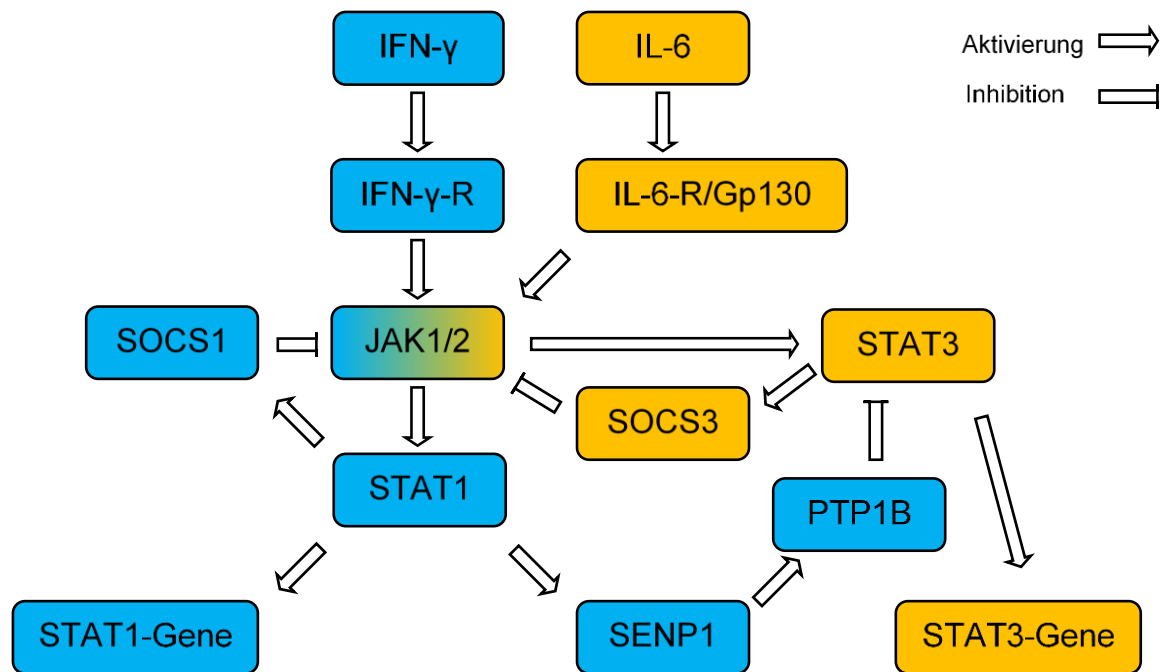


Abbildung 3 Interaktionen zwischen STAT1 und STAT3. Dargestellt ist eine Auswahl an Interaktionen zwischen STAT1 und STAT3 am Beispiel von IL-6 und IFN-γ. Dieser Regelkreis ist stark vereinfacht. Die geringe Aktivierung von STAT3 durch IFN-γ und von STAT1 durch IL-6 wurde der Übersichtlichkeit wegen nicht farblich codiert. Variiert nach Yu et al. 2017, Larsen und Ropke 2002.

3.3 Ziel der Arbeit

Chronische Schmerzen und Hyperalgesie sind im Verlauf der rheumatoiden Arthritis ein ernstzunehmendes Problem. In dieser Arbeit wurde das Verhalten der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 in der AIA und die Induktion von pSTAT3 durch die Zytokine IL-17A und IFN-γ in DRG-Kulturen untersucht. Zudem wurde der Effekt der Zytokine IL-6, IL-17A und IFN-γ auf die SOCS3-Induktion in kultivierten DRG-Neuronen eruiert.

Der Transkriptionsfaktor STAT3 wurde im Zusammenhang mit chronischer und neuropathischer Schmerzentstehung in nozizeptiven Hinterhornneuronen bereits beschrieben (Wang et al. 2014, Shen et al. 2018). Auch gibt es Hinweise, dass STAT3 auf Ebene der DRG-Neurone und weiterführend in Nozizeption und der peripheren Sensibilisierung eine Rolle spielen könnte (Li et al. 2017, Stromberg et al. 2000). Der Transkriptionsfaktor STAT1 ist in Bezug auf Schmerzentstehung auf Ebene der DRG-Neurone nicht hinreichend untersucht. In der Mikroglia des Rückenmarks konnte ein Zusammenhang zwischen STAT1 und neuropathischen Schmerzen gezeigt werden (Song et al. 2017). Des Weiteren konnten wiederholt reziproke Regulationen zwischen STAT1 und STAT3 beschrieben werden (Vgl. 3.2.3).

In der RA spielen Schmerzmediatoren wie die Zytokine IL-6, IL-17A, IL-1 β und TNF- α eine große Rolle (Schaible et al. 2010). Das Zytokin IL-17A kann zu einer erhöhten Erregbarkeit von DRG-Neuronen führen und wurde in dieser Arbeit genauer betrachtet. Ergänzend wurde IFN- γ , das in der AIA zum Teil eine gegensätzliche Wirkung zu IL-17A hat, untersucht (Ebbinghaus et al. 2017, Irmiler et al. 2007).

Unter der Hypothese, dass die Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT1 bei der Schmerzentstehung in der RA involviert sind, wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- I. Kann IL-17A in kultivierten DRG-Neuronen STAT3 aktivieren und möglicherweise über diesen Signalweg zu der beschriebenen erhöhten Schmerzantwort führen? Wie verhält sich IFN- γ bezüglich einer STAT3-Aktivierung?
- II. Werden die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 im Verlauf der experimentellen Antigen-induzierten Arthritis (AIA) in DRG-Neuronen aktiviert?
- III. Können die Zytokine IL-6, IL-17A und IFN- γ SOCS3 in kultivierten DRG-Neuronen induzieren und so Einfluss über diesen negativen Feedback-Mechanismus auf den JAK-STAT-Signalweg nehmen?

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Rattenstämme

Für die DRG-Kulturen wurden adulte Ratten vom Stamm Wistar genutzt. Dieser Auszuchtstamm wurde im Tierhaus des Universitätsklinikums Jena gezüchtet. Die Ratten wurden mit dem Gas Kohlenstoffdioxid getötet. Für Markierungen an histologischen Schnitten wurden DRGs aus weiblichen Lewis-Ratten verwendet. Lewis-Ratten sind ein Inzuchtstamm und sehr empfänglich für die Induktion autoimmuner Krankheiten. Diese Tiere wurden von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen.

4.1.2 DRG-Paraffinschnitte der adulten Ratte mit Antigen-induzierter Arthritis (AIA)

Die Paraffinschnitte wurden aus dem Bestand des Labors zur Verfügung gestellt. Sie wurden aus den DRGs von Lewis-Ratten gewonnen, denen mit einem Antigen eine Arthritis induziert worden war. Die Ratten wurden am 21. und 14. Tag vor der Induktion der AIA mit einer subcutanen Injektion von 100 µg methylierten bovinen Serumalbumin (mBSA) immunisiert. Anschließend wurde eine monoartikuläre Arthritis ausgelöst, indem 100 µg mBSA in eines der beiden Kniegelenke injiziert wurde. Die Paraffinschnitte wurden zum Tag 0 (Tag der AIA-Induktion), zum Tag 1, Tag 3, Tag 7 und Tag 21 nach Induktion einer AIA hergestellt (genauer zum AIA-Protokoll siehe (Richter et al. 2012)). Es wurden Schnitte ausgewählt, in denen die Somata der DRG-Neurone gut angeschnitten worden sind und keine Überlagerung des Gewebes vorhanden war.

4.1.3 Geräte

Zur Durchführung der Versuche wurden, neben den in **Tabelle 1** aufgeführten, auch Standardmaterialien und -laborgeräte genutzt.

Tabelle 1 Geräte

Produkte	Hersteller
Autoklav Varioklav	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzlampe HBO 100	Carl Zeiss, Jena
Zentrifuge Megafuge 1.0	Hereaus Instruments, Hanau
Sterilbank Antares 48	Sterilmilano, Mailand

Produkte	Hersteller
Stereomikroskop Stemi 2000	Carl Zeiss, Jena
Brutschrank function line	Heraeus Instruments, Hanau
Mikroskop Zellkultur Axiovert 40C	Carl Zeiss, Jena
pH Meter MultiCal® pH 538	WTW, Weilheim
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach
Gelelektrophoresekammer	Roth, Karlsruhe
CCD-Kamera	Synoptics, Cambridge, UK

4.1.4 Reagenzien, Puffer und Kulturmedien

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Die phosphatgepufferte Salzlösung wurde aus einer 5-fach konzentrierten Stammlösung hergestellt. Die Stammlösung bestand aus 40,9 g NaCl, 5,55 g NaH_2PO_4 , 1 g KCl, und 1 g KH_2PO_4 . Nach dem Herstellen der einfachkonzentrierten Lösung mit aqua destillata, wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Citratpuffer, 0,1 mol/l und pH 6

Zur Herstellung von 100 ml einer 0,1 molaren Lösung wurden 1,921 g Zitronensäure und aqua destillata verwendet. Der pH-Wert von 6 wurde mit einer 5 mol/l NaOH-Lösung eingestellt.

Antikörpermedium

Dieses Medium besteht aus 2400 μl PBS, 300 μl 10% Fischgelatine und 300 μl 10% Triton X-100.

Hams F12 +++

Zum Hams F12 wurden 10% hitze-inaktiviertes Pferdeserum, 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 1 mmol/l L-Glutamin und 10 ng/ml NGF (nerve growth factor) hinzugegeben.

Probenpuffer nach Laemmli (10 ml), 6-fach konzentriert

Zur Herstellung wurden 3 ml 20%ige SDS-Lösung, 3 ml Glycerol, 3 ml β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau und 1 ml 1 mol/l Tris (pH 7,4) verwendet.

Lysepuffer

Der Lysepuffer enthielt 20 mmol/l HEPES, 10 mmol/l EGTA, 40 mmol/l β -Glycerophosphat (Phosphatase-Inhibitor), 2,5 mmol/l MgCl_2 und 1% NP-40.

Transferpuffer

Der Puffer wurde aus 48 mmol/l Tris, 39 mmol/l Glycin, 0,037 % SDS, und 15 % bis 20 % Methanol hergestellt.

TBS-Tween (TBS-T), 5-fach konzentriert

Die TBS-T-Lösung wurde mit 0,05 mol/l Tris (6,055 g/l), 0,5 mol/l NaCl (29,22 g/l) und 0,5 % Tween 20 (5 ml/l) hergestellt.

Weitere verwendete Kulturmedien, Puffer und Reagenzien sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

Tabelle 2 Kulturmedien, Puffer und Reagenzien

Produkt	Hersteller
DPBS (w/o MgCl ₂ & CaCl ₂)	gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMEN Low Glucose	biowest®, Nuaillé
Hams F12	biowest®, Nuaillé
Gentamicin 10 mg/ml	gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham
NaOH	Fluka®, Morris Plains, New Jersey
HCl	Roth, Karlsruhe
Ethanol >99,9%	Roth, Karlsruhe
Entellan	Merck, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe
Fischgelatine	Fluka®, Morris Plains, New Jersey
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hoechst 34580	Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, Waltham
Kollagenase Typ 2	Paesel and Lorei, Hanau
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Goat-Serum	gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham
Vectastain® ABC-Kit Elite® PK-6100	Vector Laboratories, Inc., Burlingame
H ₂ O ₂ 30%ig	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Poly-L-Lysine 50 µg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pferdeserum	gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham
Penicillin 100 Einheiten/ml	gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham
Streptomycin 100 µg/ml	gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham
L-Glutamin 1 mmol/l	gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham
NGF (nerve growth factor) 10 ng/ml	Enzo, Lörrach

Produkt	Hersteller
Jenchrom px blue	MoBiTec, Göttingen
Chemiluminescent Substrat	Thermo Scientific, Bonn
Tris base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Merck, Darmstadt
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
HEPES	gibco® Thermo Fisher Scientific, Waltham
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MgCl	Roth, Karlsruhe
NP-40 1%	Merck, Darmstadt
Proteaseinhibitor cocktail tablets	Roche, Mannheim
Methanol >99,9%	Roth, Karlsruhe
PVDF-Membran	Merck, Darmstadt
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

4.1.5 Antikörper und Zytokine

Die in den Versuchen verwendeten Zytokine und Antikörper sind in **Tabelle 3** dargestellt.

Tabelle 3 Zytokine und Antikörper

Zytokine und Antikörper	Hersteller
Interferon-γ	PEPROTECH®, Hamburg
Interleukin 17A	PROSPEC, Ness-Ziona, Israel
Interleukin 6/Interleukin 6-Rezeptor	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-SOCS3-Antikörper (ab16030)	Abcam, Cambridge
Phospho-STAT3 (Tyr705) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Biotinylierter goat-anti-rabbit-Antikörper	Dako Agilent, Santa Clara
Phospho-STAT1 (Tyr701) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA
Anti-STAT3 Rabbit mAb	Cell Signaling Technology®, Danvers, USA
HRP-goat-anti-rabbit-Antikörper	KPL, Gaithersburg, USA

4.2 Methoden

4.2.1 Präparation einer adulten Ratte und DRG-Entnahme

Das Fell der Ratte wurde vom Schwanz bis zum Kopf entlang der Wirbelsäule abrasiert und die Haut mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Inzision der Haut erfolgte mithilfe einer Schere und einer chirurgischen Pinzette. Danach war die Haut mithilfe eines Skalpells von der Körperfaszie abzutrennen und aufzuklappen, damit der Bereich der Wirbelsäule frei zugänglich war. Es wurden mit dem Skalpell zwei Schnitte 1 cm lateral der Dornfortsätze von kranial bis kaudal gesetzt. Sie dienten als Einstiegspunkte, um mit der Schere die Wirbelsäule seitlich von der Muskulatur und den Rippen zu trennen. Auf Höhe des 1.-2. Zervikalwirbels und im Sakralbereich wurde die Wirbelsäule abgesetzt und dem Tier entnommen.

Der Rückenmarkskanal wurde mittig im Wechsel dorsal und ventral eingeschnitten, sodass man zwei Hälften der Wirbelsäule erhielt und das Rückenmark mittig durchtrennt war. Beide Hälften wurden mit dem Rückenmark nach unten in eine Schale mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEN) gelegt.

Unter der Vergrößerung eines Mikroskops wurden die DRGs mit einer kleinen Augenschere und einer Pinzette aus den Foramina intervertebralia herauspräpariert und in einer Schale mit DMEN gesammelt. Danach wurden sie einzeln vom überschüssigen Gewebe befreit. Die geputzten Ganglien wurden in ein Schälchen mit Kollagenase gegeben und für 100 Minuten in einem Brutschrank bei 37 °C und einer 5%igen CO₂ Atmosphäre inkubiert.

Die nächsten Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Nach der Inkubation sind die Ganglien mit einer Sigmacote-Pipette, die über einem Butangasbrenner rundgeschmolzen wurde, aus der Kollagenase in ein 15 ml Plastikröhrchen mit Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) überführt worden. Das DPBS war in diesem Schritt eine calcium- und magnesiumfreie Version, da das Trypsin durch diese Ionen gehemmt werden würde. Nach dem Heruntersinken der Ganglien wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und der Vorgang wiederholt. Im Anschluss wurden die DRGs in vorgewärmtes Trypsin (37 °C) aufgenommen und 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach dem Abpipettieren des Trypsins wurden die DRGs zweimal mit 15 ml DMEN gewaschen. Anschließend wurden die Ganglien zweimal in 5 ml DMEN kräftig geschüttelt und ca. zehnmal geschlagen, um die Neurone aus den DRGs zu vereinzeln.

Die nun entstandenen Zellsuspensionen wurden vom übrigen Gewebe, das sich am Boden des Röhrchens abgesetzt hatte, abgehoben und gesammelt. Jetzt erfolgten zwei Zentrifugationsschritte für jeweils 8 Minuten bei 1600 rpm. Dazwischen wurde der Überstand bis 4 ml über dem Pellett abgezogen, dann wurde das Röhrchen mit neuem DMEN aufgefüllt und die Zellen resuspendiert. Nach der zweiten Zentrifugation wurde der Überstand bis zum Pellett abgezogen, verworfen und anschließend Hams F12 +++ auf das Pellett gegeben. Hier wurden pro später benötigtem Deckgläschen 50 µl und zusätzlich 100 µl Pipettierreserve als Volumen genutzt. Danach wurden die Zellen in dem Hams F12+++ aufgewirbelt und je 50 µl der Zellsuspension auf die entsprechende Anzahl Deckgläschen in die 12-Well Mikrotiterplatte gegeben. Nach ca. 5 Stunden konnte die erste Fütterung mit je 1 ml Hams F12+++ erfolgen.

Bei einer Versuchsmodifikation wurde anstatt des Hams F12 +++ nur DMEN genutzt, um den Stoffwechsel der DRG-Neurone in einem nährstoffarmen Medium auf niedrigem Niveau zu halten. Alle verwendeten Deckgläschen wurden vor diesen Schritten mit Poly-L-Lysin beschichtet, damit die DRG-Neurone auf diesen anwachsen können.

Tabelle 4 Zytokine

Zytokine zur Stimulation	Stimulationszeiten in Minuten
Interleukin 17A, 200 ng/ml	15, 30, 60, 120, 180
Interferon-γ, 100 ng/ml	15, 30, 60, 120, 180
Interleukin-6/Interleukin-6-Rezeptor, 50 ng/ml	60, 120, 180

4.2.2 Stimulation von kultivierten DRG-Neuronen der adulten Ratte

Zu Beginn der Stimulationen mussten die DRG-Neurone zunächst für 3 bis 4 Stunden in DMEN hungern, um den Stoffwechsel herunterzufahren. In dem Versuch zur SOCS3-Markierung wurde diese Zeitspanne auf 48 Stunden erhöht, um den Zellstoffwechsel maximal herunterzufahren. Anschließend wurde mit verschiedenen Zytokinen zu verschiedenen Zeiten (**Tabelle 4**) stimuliert, indem die Zytokine dem DMEN zugesetzt worden waren. Zum Beenden der Stimulation und zum Fixieren der DRG-Neurone wurde das DMEN mit 4% Paraformaldehyd ausgetauscht (**Abbildung 4**). Nach 30 Minuten wurden die DRG-Neurone dreimal in PBS gewaschen und darin im Kühlschrank gelagert. Diverse Kontrollen haben diese Schritte mit durchlaufen:

Eine Kontrolle wurde ohne Stimulation durchgeführt, um den Unterschied zur Stimulation zu zeigen und eine Kontrolle wurde weder stimuliert, noch mit einem Sekundärantikörper markiert, um die Hintergrundfluoreszenz einzuschätzen.

Auch wurde in Kontrollen überprüft, wie spezifisch der Sekundärantikörper bindet, indem nur mit diesem inkubiert worden war.

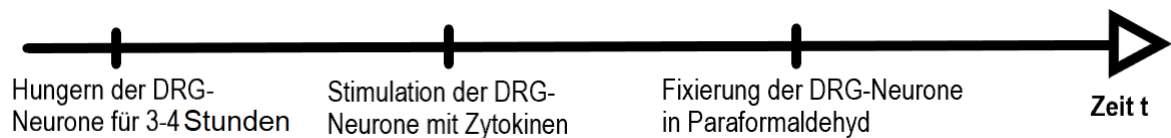


Abbildung 4 Stimulationsschema

4.2.3 Antikörpermarkierung an kultivierten DRGs der adulten Ratte

Damit die Antikörper sich besser an die entsprechenden Epitope der Antigene binden konnten, wurden die DRG-Neurone für 15 Minuten bei 120 °C in einer 0,1 mol/l Citratpufferlösung autoklaviert, um die Bindungsstellen zu demaskieren. Nach dem langsamen Abkühlen folgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS für je 10 Minuten.

Der folgende Blockschrift erfolgte mit 2%igem Ziegenserum in einer PBS+0,3% Triton-X-100-Lösung. Dazu waren die Deckgläschen mit den DRG-Neuronen mit 50 µl des Blockmediums für 30 Minuten inkubiert worden. Ziel des Blockens war es, unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu besetzen. Die primären Antikörper sind 1:50, 1:100 oder 1:200 mit dem Antikörpermedium verdünnt und zu je 50 µl pro Deckgläschen aufgebracht worden. Die Inkubation in einer feuchten Kammer erfolgte über Nacht im Kühlschrank.

Nun wurden die DRG-Neurone wieder dreimalig mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper „goat-anti-rabbit“ (GAR)-Alexa 488 für 2 bis 3 Stunden in einer feuchten und dunklen Kammer bei Raumtemperatur. Der Antikörper wurde mit dem Antikörpermedium 1:200 verdünnt. Teilweise wurden die DRG-Neurone noch mit Hoechst 34580 gefärbt, um die Zellkerne darzustellen. Dazu wurden die Präparate in einer 1:500 Verdünnung mit PBS für 5 Minuten dunkel inkubiert. Davor und danach wurde wieder ein Waschschrift in PBS durchgeführt. Im Weiteren wurden je drei Deckgläschen auf einem Objektträger eingedeckelt. Dafür sind die DRG-Neurone mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 96% und 100%) dehydratisiert worden. Bevor sie dann mit Entellan eingedeckelt wurden, sind die Deckgläschen zweimal durch ein Xylolbad gezogen worden. Nach dem Trocknen unter dem Abzug wurden die Objektträger lichtgeschützt und kühl gelagert.

4.2.4 Antikörpermarkierung an Paraffinschnitten der AIA-Ratte

Pro Versuch wurden 6 Paraffinschnitte ausgewählt: Tag 0, 1, 3, 7, 21 nach AIA-Induktion sowie Schnitte aus gesunden Kontrolltieren. Zuerst musste das Paraffin entfernt werden. Dafür wurden die Objektträger durch eine absteigende Alkoholreihe (Xylol, 100% Ethanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol, 50% Ethanol) gezogen. Schließlich überführte man die Objektträger in destilliertes Wasser. Im Anschluss wurden die Objektträger demaskiert (Vgl. 4.2.3). Danach erfolgte ein dreimaliger Waschschrift in PBS für 10 Minuten. Der folgende Blockschrift wurde mit 2%igem Ziegenserum in einer PBS+0,3% Triton-X-100-Lösung durchgeführt. Dieser dauerte 30 Minuten. Dazu wurden 100 µl auf den Objektträger aufgetragen. Das Präparat darauf wurde vorher mit einem Fettstift umfahren, damit die folgenden Inkubationsmedien darauf nicht verlaufen konnten. Nach dem Blockschrift inkubierte der Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer.

Der eingesetzte pSTAT3-Antikörper wurde im Antikörpermedium 1:50 und der pSTAT1-Antikörper 1:100 verdünnt. Davon wurden je 100 µl pro Objektträger aufgetragen. Nach dieser Inkubation folgte wieder ein Waschschrift mit PBS.

Der biotinylierte Sekundärantikörper GAR wurde 1:200 im Antikörpermedium verdünnt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Objektträger wieder in PBS gewaschen. Nun wurde das ABC-Kit (avidin-biotin-peroxidase complex) eingesetzt. Dazu wurden die Lösungen A und B 1:200 mit dem Antikörpermedium verdünnt und 30 Minuten vor Gebrauch gemischt. Anschließend wurden 100 µl pro Präparat aufgetragen und für 40 Minuten inkubiert. Die Präparate wurden mit PBS gewaschen.

Das Peroxidase-Substrat Jenchrom wurde mit einem 20 µm Pipettenfilter filtriert, um eventuell gebildete Komplexe zu entfernen, bevor es mit 15 µl 10%igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gestartet wurde. Die Inkubationsdauer wurde daran angepasst, wie schnell das Jenchrom dunkel ausgefallen ist, und belief sich zwischen 10 bis 30 Minuten. Danach wurden die Objektträger dreimalig in destilliertem Wasser gewaschen und über eine aufsteigende Alkoholreihe in Entellan eingedeckelt.

Die Avidin-Biotin-Methode beruht auf Arbeiten von Hsu, Su-Ming (Hsu et al. 1981). Hierbei macht man sich die hohe Affinität von Avidin und Biotin zunutze. Das Glycoprotein Avidin hat vier Untereinheiten und jede dieser kann ein Biotinmolekül binden.

Das in Lösung A enthaltene Avidin bindet sich an den biotinkoppelten Sekundärantikörper. Das in Lösung B befindliche Biotin ist an eine Peroxidase gebunden. Je 3 dieser Biotin-Peroxidase-Komplexe können nun an das Avidin binden. So wird ein Amplifikationseffekt erreicht und das macht die Methode sehr sensitiv. Kontrollversuche wurden unter Abwesenheit vom Primärantikörper durchgeführt.

4.2.5 Western Blot

Die DRG-Neurone wurden aus Wistar-Ratten gewonnen und in Kultur gebracht (Vgl.4.2.1). Die Inkubation erfolgte mit den Zytokinen IFN- γ (100 ng/ml) und IL-6 (IL-6/sIL-6R 50 ng/ml) und mit den Inkubationszeiten von 1, 5, 15, 30 und 60 Minuten. Die Reaktion wurde nach Ablauf der Zeit im Eisbad beendet. Nach dem Abpipettieren des Überstands wurde den Zellen der Lysepuffer hinzugefügt. Das führte zur Lyse und Denaturierung der Proteine. Danach erfolgte ein Gefrier- und Auftauschritt. Im Anschluss wurden die Zelllysate zentrifugiert. Ferner wurde der Probenpuffer nach Laemmli den Überständen hinzugefügt und für 5 Minuten bei 95 bis 100 °C gekocht. Danach erfolgten ein Zentrifugationsschritt und die Abkühlung der Proben.

Um die Proteine analysieren zu können, wurden die Proteinproben auf das 10%ige PAGE-Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief bei einer Spannung von 125 V. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe des Transferpuffers auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. Danach wurde ein Blockschritt mit 5% Milch in TBS-T für 1 Stunde durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit dem pSTAT3-Antikörper inkubiert. Die dazugehörige Ladekontrolle wurde mit einem anti-STAT3-Antikörper markiert. Die Ladekontrolle gewährleistet, dass sich in jeder Probestasche die gleiche Menge an Proteinlösung befindet, und so Unterschiede im Signal nicht einfach einer fehlerhaften Mehrbeladung einer Probestasche im Gel zugrunde liegen.

Als Sekundärantikörper wurde „horseradish peroxidase“ (HRP)-GAR genutzt. Zwischen dem Blockschritt und den Antikörpermarkierungen erfolgten Waschvorgänge mit TBS-T. Das Signal wurde über ein Lumineszenzsubstrat erzeugt, dass durch eine chemische Reaktion am HRP des Sekundärantikörpers Licht emittiert. Mit einer CCD-Kamera wurden anschließend Aufnahmen gemacht und so visualisiert.

4.2.6 Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie

Die Objektträger mit dem Fluoreszenzantikörper AlexaFluor® 488 wurden mit 495 nm Licht angeregt und abfotografiert. Versuche mit biotinylierten Sekundärantikörpern wurden unter Auflichtmikroskopie abfotografiert. Bei Versuchen mit positiven Kernanfärbungen wurde eine 200-fache Vergrößerung gewählt. In Versuchen, bei denen der mittlere Grauwert bestimmt wurde, war hingegen eine 400-fache Vergrößerung zielführend. Um repräsentative Grauwerte zu erreichen, wurde die Belichtungszeit der Aufnahmen auf 500 ms festgelegt und ein Weißabgleich bei 3200 K durchgeführt. Die Aufnahmen wurden zu vergleichbaren Tages- und Lichtverhältnissen gemacht. Um die Objektträger systematisch fotografieren zu können, wurden die Präparate mäanderförmig durchfahren und wenn Zellen in das Sichtfeld kamen, wurde jeweils eine Aufnahme gemacht (**Abbildung 5**). Die Aufnahmen sind mithilfe des Programms AxioVision Version 4.8 erstellt worden. Ausgewertet wurde das prozentuelle Verhältnis von Zellen mit positiver Kernanfärbung zu Zellen mit ungefärbtem Kern. Es wurden nur Zellen als positiv gezählt, bei denen der Kern klar abgrenzbar war (**Abbildung 6**).

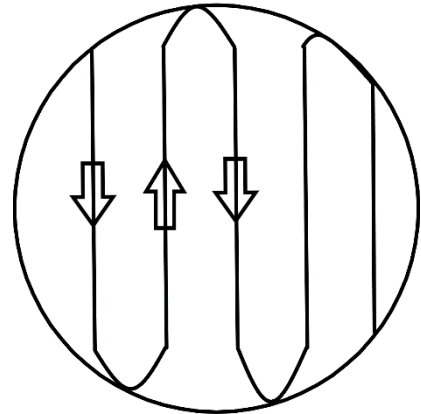


Abbildung 5 Systematisches Fotografieren des Präparats

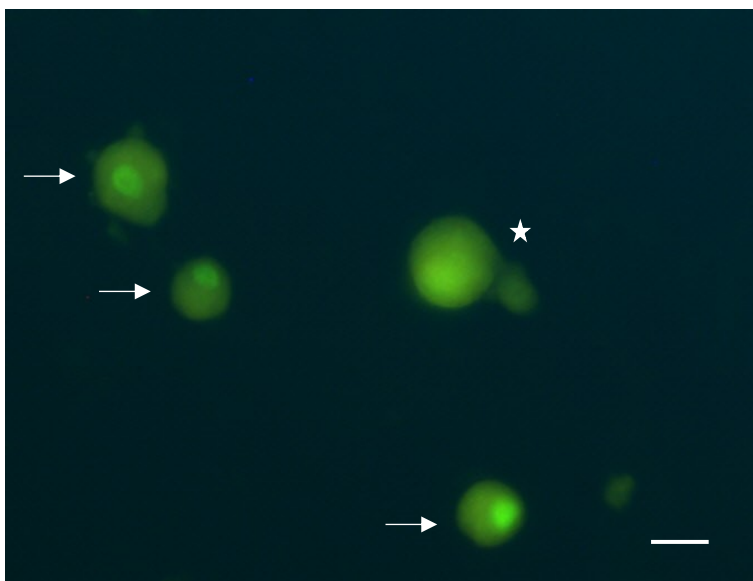


Abbildung 6 DRG-Neurone nach pSTAT3-Markierung in der Fluoreszenz-mikroskopie. Dargestellt ist ein typischer Bildausschnitt mit eindeutigen, positiven Kernanfärbungen (Pfeile) der DRG-Neurone. Ebenso sind DRG-Neurone ohne eindeutige Kernfärbung zu erkennen (Stern). Maßstab 10 µm.

Um den Grauwert zu bestimmen, wurden die Zellen am Computer händisch umkreist und durch eine Funktion des oben genannten Programms ausgewertet. Folgende Daten wurden so von den DRG-Neuronen gewonnen: Fläche, Umfang, Radius und Grauwert. Die Grauwerte der DRG-Neurone wurden nach ihrer Häufigkeit in je 5er Intervalle eingeteilt. Der Bereich der Grauwerte erstreckte sich in diesem Fall von 0 bis 300 und besitzt keine Einheit. Ein höherer Grauwert spricht für eine höhere Lichtintensität.

4.2.7 Statistische Auswertung

Die Erstellung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Sigmaplot Version 13. Als statistische Tests kamen der einseitige und zweiseitige t-Test und der One-Way ANOVA zum Einsatz. Um diese durchführen zu können, wurde vorher auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk Test getestet. Anschließend wurde der Brown-Forsythe Test angewendet, um die Stichproben auf gleiche Varianzen zu prüfen. Wenn der Test auf Normalverteilung fehlgeschlagen war, erfolgte statt eines t-Tests ein Mann-Whitney Rank-Sum Test. Die Ergebnisse wurden zusammen mit dem Standardfehler (\pm SEM, „standard error mean“) angegeben.

Als statistisch signifikanter Unterschied wurde $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Der Effekt von Interleukin-17A auf pSTAT3 in kultivierten DRG-Neuronen

Um zu überprüfen, ob IL-17A grundsätzlich in der Lage ist, in DRG-Neuronen den Transkriptionsfaktor STAT3 zu aktivieren, wurde das aktive, also das phosphorylierte STAT3 (pSTAT3) mit einem pSTAT3-Antikörper (Verdünnung 1:100) markiert. Während STAT3 im Zytoplasma vorkommt, befindet sich das aktive pSTAT3 vorwiegend im Zellkern. Daher lag der Fokus auf den angefärbten Zellkernen. Es wurde das prozentuale Verhältnis angefärbter Zellkerne zu unauffälligen gebildet (**Abbildung 7**). Es wurden DRG-Kulturen von 6 Ratten gegen die Kontrollen verglichen.

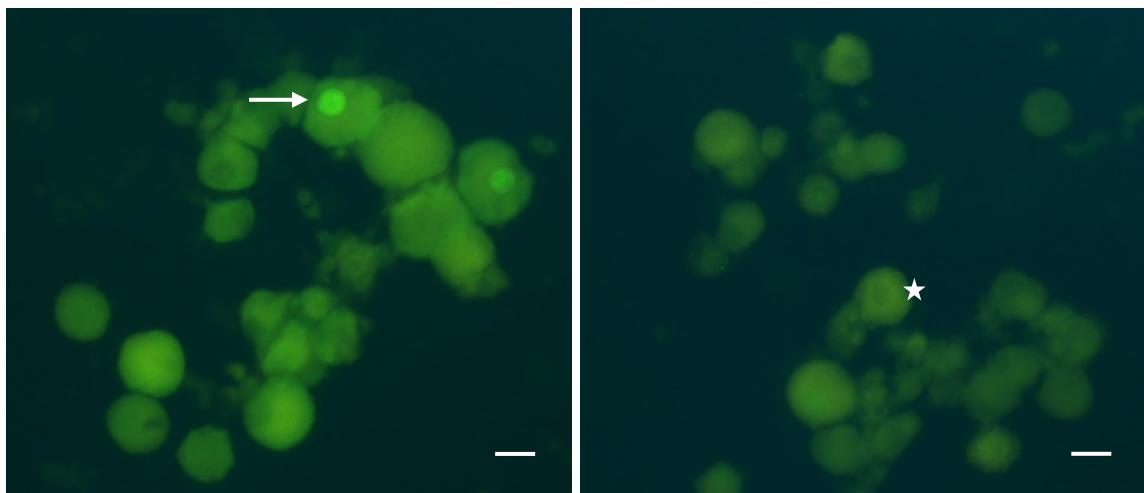


Abbildung 7 IL-17A und pSTAT3 in der Fluoreszenzmikroskopie. Dargestellt sind DRG-Neurone, die mit einem pSTAT3-Antikörper angefärbt wurden: Links nach IL-17A-Stimulation für 30 Minuten und rechts ohne Stimulation. Die DRG-Neurone, die pSTAT3 hochreguliert haben, weisen einen hellen Zellkern auf (Pfeil). Teilweise erscheinen manche Nuklei dunkler als die Hintergrundfluoreszenz (Stern). Die Kontrolle wirkt insgesamt etwas dunkler als die Stimulation. Da die Belichtungszeit zwischen den Präparaten automatisch angepasst wurde, kann die Helligkeit des Zytoplasms der Neurone nicht zwischen der Stimulation und der Kontrolle verglichen werden. Maßstab 10 μ m.

Zunächst ließ sich zeigen, dass IL-17A in der Lage ist STAT3 zu aktivieren. Die DRG-Kulturen wurden mit je 200 ng/ml IL-17A für 15, 30 und 60 Minuten stimuliert. Im Mittel waren über alle Zeitpunkte hinweg die Zellkerne der DRGs zu etwa $6,8\% \pm 0,6\%$ angefärbt. Im Vergleich dazu waren in der Kontrollgruppe nur $3,4\% \pm 1,0\%$ der Zellkerne markiert (**Abbildung 8**). Im zweiseitigen t-Test erreicht dieses Ergebnis (p-Wert = 0,01, zweiseitiger t-Test) statistische Signifikanz.

Im Weiteren wurde untersucht, inwiefern die STAT3-Aktivierung einer zeitlichen Dynamik unterliegt. Dazu wurden die verschiedenen Stimulationszeiten von 15, 30 und 60 Minuten einzeln betrachtet und mit der Kontrolle verglichen. Nach 15 Minuten hatten im Mittelwert $5,8\% \pm 1,0\%$ der DRG-Neurone einen markierten Zellkern, nach 30 Minuten $8,2\% \pm 1,0\%$ und nach 60 Minuten $6,6\% \pm 1,0\%$. Bei der Kontrolle sind hingegen $3,4\% \pm 1,0\%$ der Zellkerne angefärbt gewesen (**Abbildung 9**).

Der Höhepunkt der Aktivierung wird nach 30 Minuten erreicht (p-Wert = 0,013, zweiseitiger t-Test). Die Stimulationszeiten von 15 Minuten und 60 Minuten erreichen mit p-Werten von $p=0,125$ und $p=0,085$ keine statistische Signifikanz.

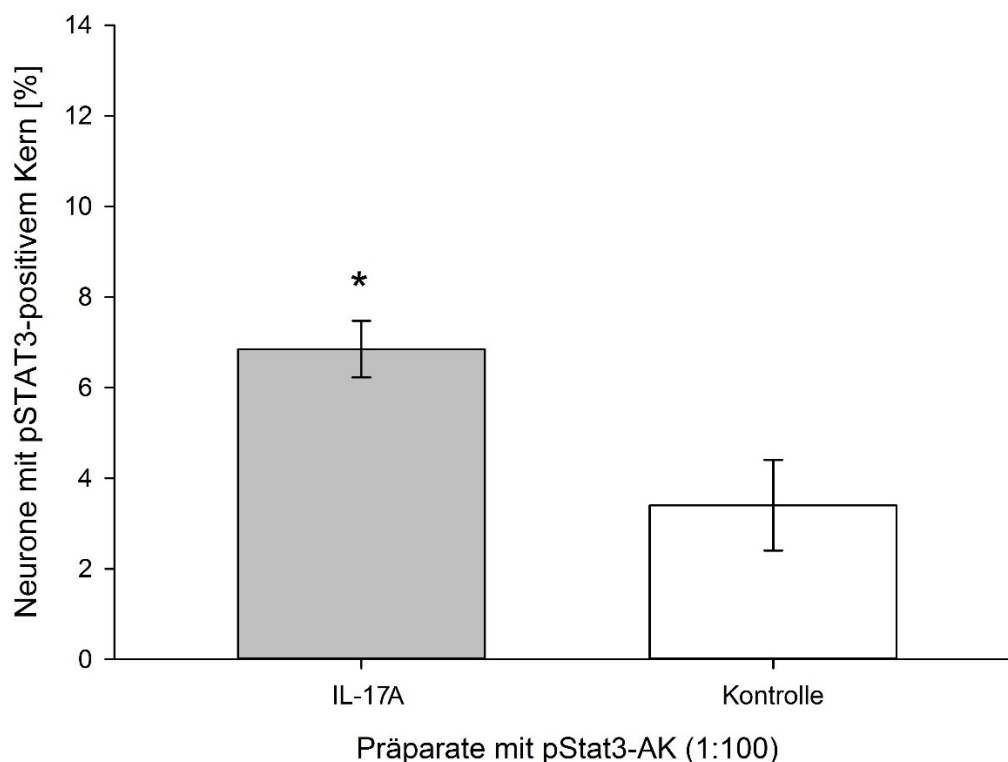


Abbildung 8 pSTAT3-Expression nach IL-17A-Stimulation. Dargestellt ist die Intervention mit IL-17A (200ng/ml) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Stimulationszeiten von 15, 30 und 60 Minuten sind in Summe aller IL-17A-Interventionen zusammen gegen die Kontrolle betrachtet worden. Die Stimulation mit IL-17A führt zu einer Hochregulation von pSTAT3 in DRG-Neuronen. Der pSTAT3-Antikörper wurde 1:100 mit dem Antikörpermedium verdünnt. Die Versuchszahl beträgt N=6 unabhängige Kulturansätze. Aufgetragen sind die Mittelwerte der positiven Kernfärbungen \pm SEM. * $p<0,05$ (zweiseitiger t-Test)

Abschließend kann festgehalten werden, dass IL-17A in DRG-Neuronen zu einer Hochregulation von pSTAT3 führen kann und das Maximum dieser pSTAT3-Expression nach 30 Minuten erreicht wird. Jedoch reagiert nur ein kleiner Teil der DRG-Neurone mit einer pSTAT3-Induktion auf eine IL-17A-Stimulation.

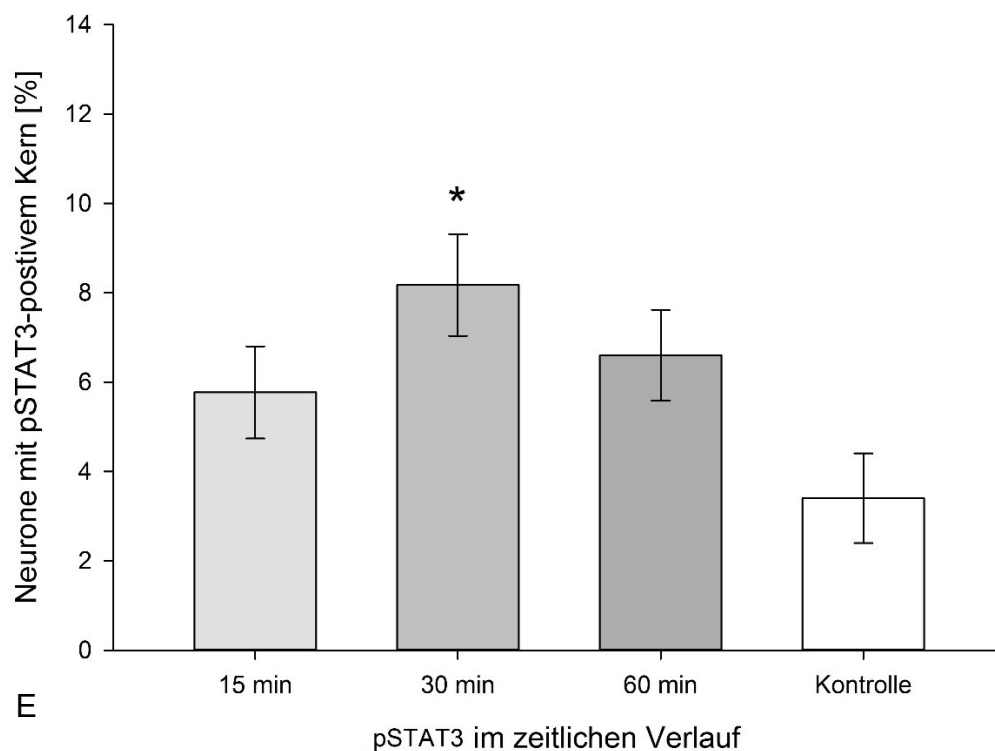
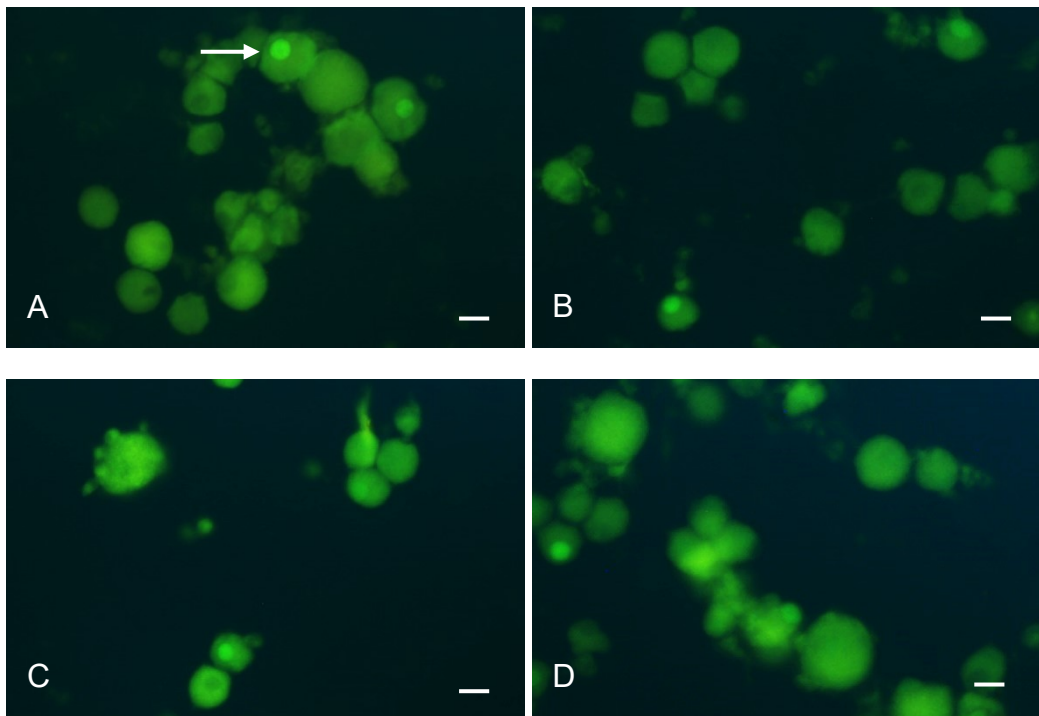


Abbildung 9 pSTAT3-Dynamik nach IL-17A-Stimulation. Dargestellt ist die Auswertung der pSTAT3-Dynamik und je eine typische Aufnahme aus der Fluoreszenzmikroskopie. Die Stimulationszeiten mit 200 ng/ml IL-17A waren 15 (A), 30 (B) und 60 (C) Minuten. Dem gegenüber steht die Kontrollgruppe (D). Die DRG-Neurone, die pSTAT3 hochreguliert haben, weisen einen hellen Zellkern auf (Pfeil). Während nach 15 Minuten keine signifikante Regulation von pSTAT3 stattfindet, ist pSTAT3 nach 30 Minuten hochreguliert (E). Nach 60 Minuten ist die pSTAT3-Induktion bereits wieder beendet. Der pSTAT3-Antikörper wurde 1:100 mit dem Antikörpermedium verdünnt. Die Versuchszahl beträgt N=6 unabhängige Kulturansätze. Aufgetragen sind die Mittelwerte der positiven Kernfärbungen \pm SEM. * $p < 0,05$ (One-Way ANOVA Test). Maßstab 10 μ m.

5.2 Der Transkriptionsfaktor pSTAT1 in der AIA

Der Transkriptionsfaktor STAT1 steht im engen Zusammenhang mit dem Zytokin IFN- γ , das als eines der Hauptaktivatoren des JAK-STAT1-Signalweges gilt. Die wichtige Rolle von IFN- γ in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis mit teils protektiven, teils fördernden Effekten wurde bereits erläutert (Vgl. 3.1.3). Inwiefern IFN- γ in DRG-Neuronen über den JAK-STAT1-Signalweg eine Rolle spielen könnte, wurde in der AIA untersucht.

Es wurden Paraffinschnitte von AIA-Ratten mit dem pSTAT1-Antikörper inkubiert. Der Antikörper wurde 1:100 mit dem Antikörpermedium verdünnt. Es wurde die Avidin-Biotin-Methode mit dem Peroxidase-Substrat Jenchrom angewendet. Eine Schnittserie bestand je aus Tag 0, 1, 3, 7, 21 nach AIA-Induktion und Schnitten von gesunden Ratten. Es wurden 6 Schnittserien betrachtet.

In der Lichtmikroskopie zeigte sich in einigen Paraffinschnitten eine eindeutige schwarze Anfärbung der Zellkerne (**Abbildung 10**). Diese traten besonders in der Kontrolle und am Tag 21 auf. Im Gegensatz dazu waren kaum angefärbte Zellkerne in Paraffinschnitten der Tage 0, 3 und 7 zu beobachten. Der Tag 0 entspricht einer internen Kontrolle, zu deren Zeitpunkt die Ratten zwar bereits mit mBSA immunisiert worden waren, aber noch bevor die AIA ausgelöst wurde.

Nach dem Abfotografieren und Auszählen der Zellkerne bestätigte sich der erste Eindruck aus der Lichtmikroskopie. Die Kontrolle ($31,7\% \pm 2,0\%$) und der Tag 21 ($31,2\% \pm 2,4\%$) hatten ein ähnlich hohes prozentuales Verhältnis angefärbter Zellkerne. Am Tag 0 ($5,3\% \pm 1,0\%$), noch vor der AIA-Induktion, ist der Anteil der DRGs mit positiver pSTAT1-Färbung rapide abgesunken. Zu Beginn der AIA am Tag 1 ($5,2\% \pm 1,1\%$) und am Tag 3 ($6,8\% \pm 1,2\%$) bleibt der Anteil an pSTAT1-positiven Neuronen niedrig. Erst ab dem Tag 7 ($10,2\% \pm 2,3\%$) beginnt er wieder deutlich anzusteigen. Zum Tag 21 hat es dann wieder sein Grundniveau erreicht und entspricht in etwa der Kontrolle (**Abbildung 11**). Bis auf Tag 21 besteht jeweils zwischen Kontrolle und Tag 0, 1, 3 und 7 ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert $p < 0,001$ (One-Way ANOVA Test).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass allein die Immunreaktion auf das Antigen mBSA reicht, um die Grundexpression des Transkriptionsfaktors pSTAT1 stark herunterzufahren. Während der akuten Phase der AIA bleibt diese Grundexpression erniedrigt und steigt erst am Ende der AIA wieder an.

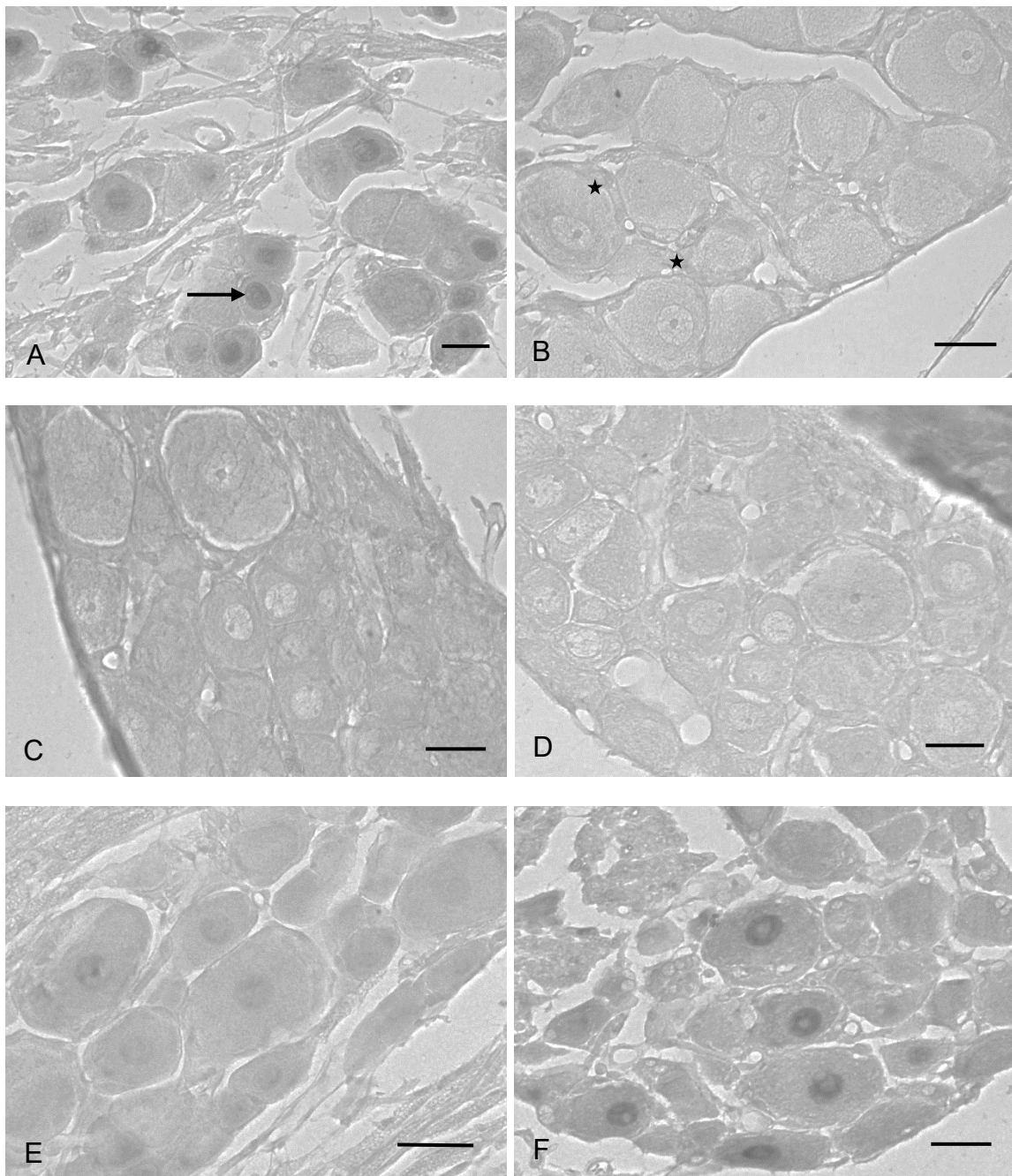


Abbildung 10 pSTAT1 im zeitlichen Verlauf der AIA. Dargestellt sind typische Aufnahmen der Paraffinschnitte von Spinalganglien. Deren Neurone mit ihrem Zellkern und Nukleolus sind gut erkennbar. Weiterhin finden sich um die Neurone herum Satellitenzellen (Sterne). Seitlich ist manchmal die Kapsel der Spinalganglien mit angeschnitten. In der Kontrolle (A) fallen die angefärbten, gut abgrenzbaren Zellkerne auf (schwarzer Pfeil). Am Tag 0, 1 und 3 (B, C, D) sind solche jedoch kaum zu finden. Am Tag 7 (E) der AIA steigt die Anzahl angefärbter Zellekerne wieder an und am Tag 21 (F) erreicht sie wieder das Ausgangsniveau in Höhe der Kontrolle. Maßstab 10 μ m.

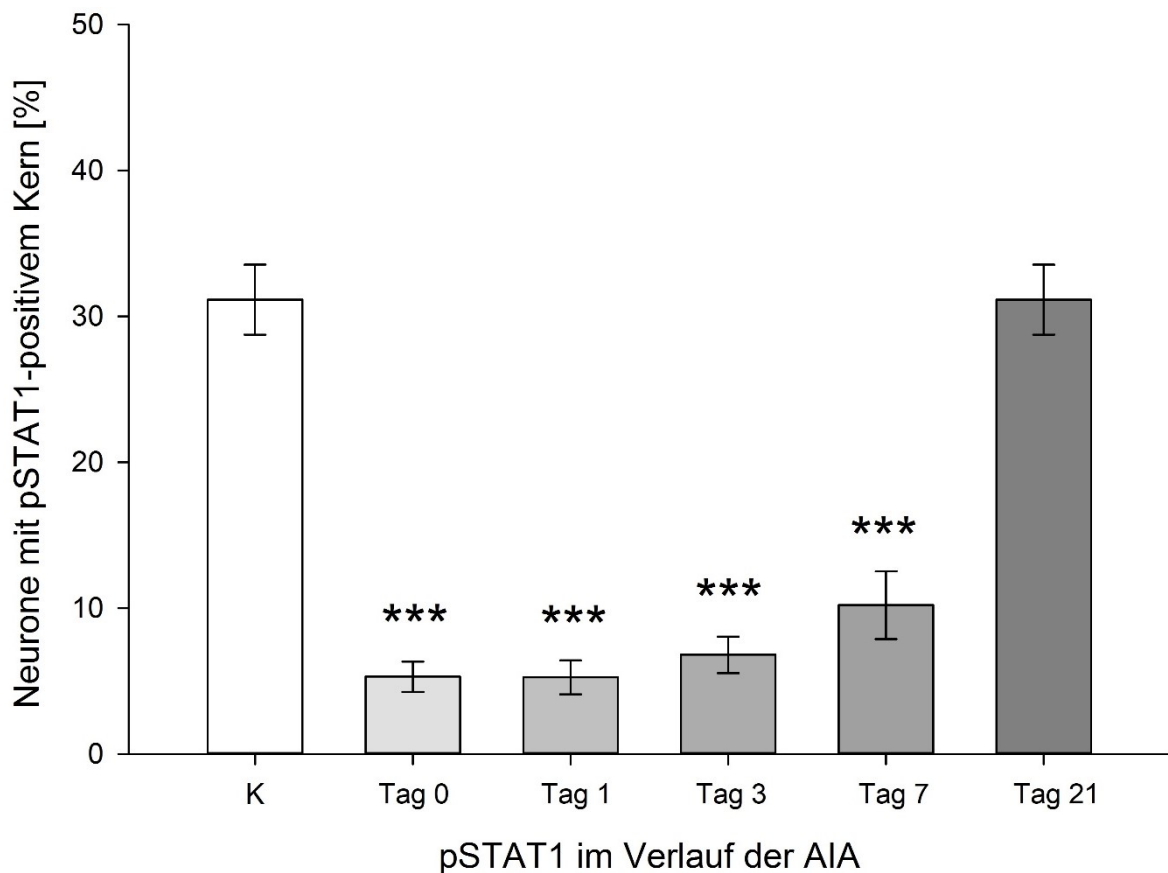


Abbildung 11 pSTAT1 im zeitlichen Verlauf der AIA. In dem Diagramm ist der prozentuale Anteil der Neurone mit angefärbten, also pSTAT1-positiven, Zellkernen im Verlauf der AIA dargestellt. Zum Tag 0 sinkt der pSTAT1-Level stark im Vergleich zur Kontrolle ab. Mit Induktion der AIA bleibt die pSTAT1-Expression niedrig. Erst mit dem Tag 7 beginnt langsam wieder der Anstieg. Zum Tag 21 ist das Ausgangsniveau von pSTAT1 wieder erreicht. Die Versuchszahl beträgt N=6 Ratten. Aufgetragen sind die Mittelwerte der positiven Kernfärbungen \pm SEM. *** $p < 0,001$ (One-Way ANOVA Test)

5.3 Der Transkriptionsfaktor pSTAT3 in der AIA

In kultivierten DRG-Neuronen hat IL-17A einen signifikanten Effekt auf die pSTAT3-Bildung. Um festzustellen, ob jener Effekt auch an Ratten mit Antigen-induzierter Arthritis in vivo auftritt, wurden Paraffinschnitte von AIA-Ratten mit dem bereits verwendeten pSTAT3-Antikörper inkubiert und mit der Avidin-Biotin-Methode markiert. Es wurden jeweils Tag 0, 1, 3, 7, 21 und die Kontrolle der AIA (gesunde Ratten) untersucht. Die Versuchszahl betrug N=3 Ratten.

In den Versuchen zeigte sich in der mikroskopischen Auswertung keinerlei Hinweis auf eine Hochregulation von pSTAT3 zu irgendeinem der genannten Zeitpunkte (**Abbildung 12**). Um eventuell doch eine pSTAT3-Aktivierung nachweisen zu können, wurde die Inkubationszeit mit dem Peroxidase-Substrat Jenchrom relativ lang gewählt. Deshalb ist es zum Teil flockenartig und gleichmäßig über dem Präparat

dunkel ausgefallen. Im Gegensatz zur Zellkultur ist in den Paraffinschnitten in der AIA keine ausgeprägte und länger bestehende pSTAT3-Hochregulation erkennbar.

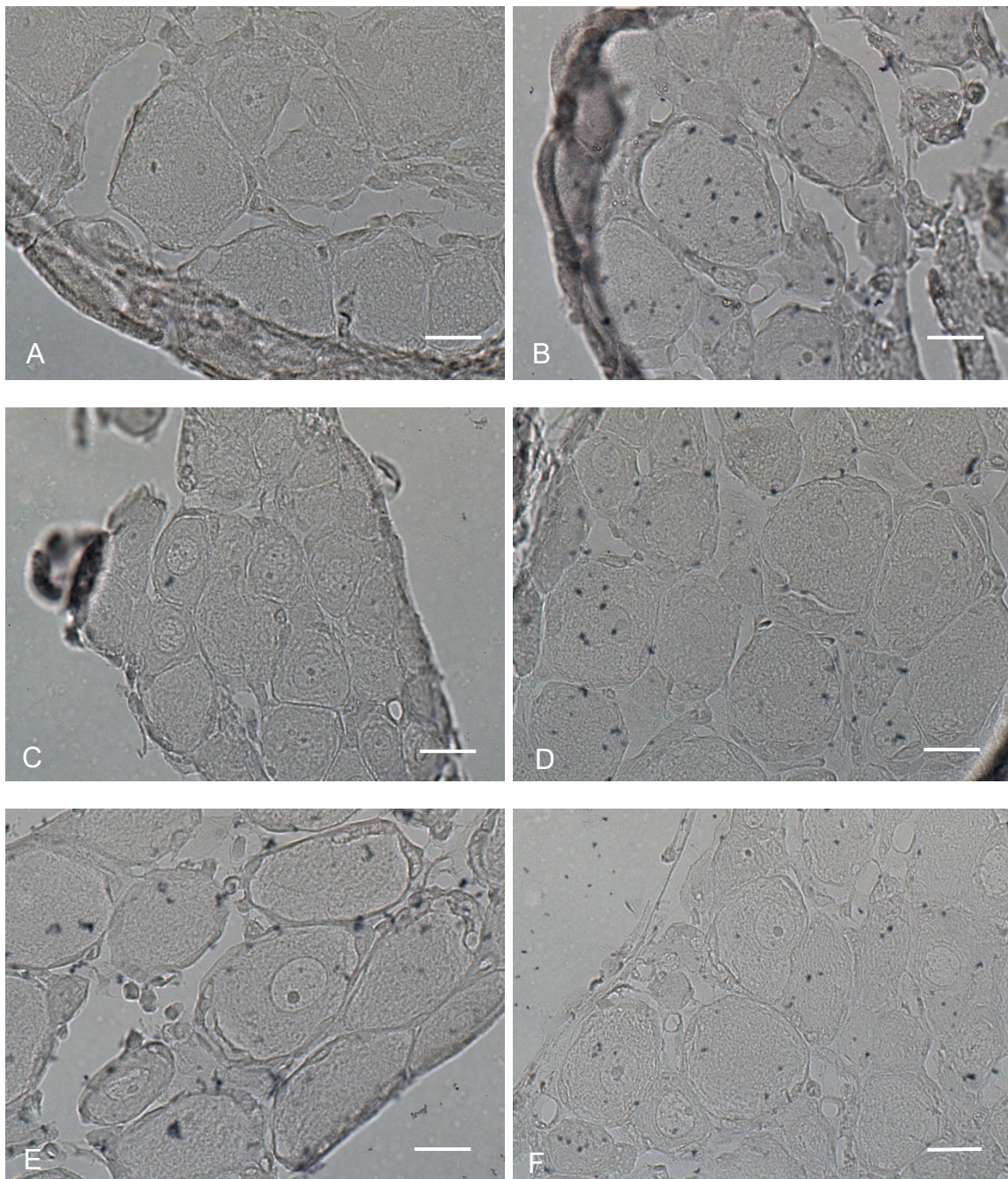


Abbildung 12 Paraffinschnitte von Spinalganglien nach AIA. Darstellung der Spinalganglien von Ratten mit AIA am Tag 0 (A), Tag 1 (B), Tag 3 (C), Tag 7 (D), Tag 21 (E) und der Kontrolle (F). Angeschnitten sind die Somata der Nervenzellen, die sie umgebenden Satellitenzellen, Axone und Fibroblasten. Innerhalb der Nervenzellen sind die Nuklei und Nukleoli gut erkennbar. Es ist keine Anfärbung der Nuklei erkennbar. In den Paraffinschnitten der AIA-Ratten ist keine pSTAT3-Hochregulation auszumachen. Der pSTAT3-Antikörper wurde 1:50 mit dem Antikörpermedium verdünnt. Das Peroxidase-Substrat Jenchrom ist teilweise flockenartig ausgefallen. Die Versuchszahl beträgt N=3 Ratten. Maßstab 10 µm.

5.4 Der Effekt von Zytokinen auf pSTAT3 und SOCS3 in DRG-Neuronen

5.4.1 Orientierende Vorversuche

Da in der AIA im Gegensatz zur DRG-Kultur keine Hochregulation von pSTAT3 nachweisbar war, wurde der spezifische Suppressor SOCS3 dieses Transkriptionsfaktors genauer untersucht. In der AIA spielen viele Zytokine eine Rolle, die sich gegenseitig beeinflussen. Es besteht die Möglichkeit, dass es nach einer anfänglich starken pSTAT3-Hochregulation durch einen negativen Feedback-Mechanismus über SOCS3 wieder zu einem Abfall des pSTAT3 kommt. In der DRG-Kultur wurde nach der Stimulation mit den Zytokinen IFN- γ , IL-17A und IL-6 (IL-6/sIL-6R) die Induktion von SOCS3 untersucht. Dabei wurden die DRG-Kulturen einzeln mit den Zytokinen und den Stimulationszeiten von 1, 2 und 3 Stunden inkubiert. Die Konzentrationen der Zytokine sind der **Tabelle 4** zu entnehmen. IFN- γ wurde in einigen Arbeiten als protektiv in der RA beschrieben (Irmmler et al. 2007). Aus diesem Grund wurden weitere Stimulationen mit IL-17A und IL-6 jeweils mit IFN- γ zusammen durchgeführt, um nachzuprüfen, ob in diesem Fall SOCS3 besonders stark induziert wird. Die Stimulationszeiten blieben die gleichen. Der SOCS3-Antikörper wurde 1:100 mit dem Antikörpermedium verdünnt. Anschließend wurden die Grauwerte der DRG-Neurone bestimmt und nach der Häufigkeit ihrer Grauwerte grafisch dargestellt.

Es zeigten sich in den ersten Überblicksversuchen keine eindeutigen Tendenzen auf Unterschiede der Grauwerte und somit in der SOCS3-Induktion bei einer Versuchszahl von N=1 unabhängigen Ratten (**Abbildung 13**). Die Kontrolle zeigte sogar etwas höhere Grauwerte als die Interventionen. Eine zweite Kontrolle ohne den Primärantikörper war hier leider nicht verwertbar. Deshalb wurde die Stimulationsmethode unter der Annahme, dass nach 3-4 Stunden Hungern der Zellstoffwechsel noch zu aktiv ist und SOCS3 in den DRG-Neuronen noch nicht seinen Basisspiegel erreicht hat, modifiziert. Die Hungerperiode der DRG-Kulturen wurde auf 48 Stunden erhöht. Auch nach 48 Stunden Hungerperiode waren keine eindeutigen Tendenzen der SOCS3-Induktion erkennbar. Nur nach 1 Stunde in der einzelnen Stimulation mit IFN- γ zeigte sich ein Hinweis auf eine verstärkte SOCS3-Induktion (**Abbildung 14** graue Linie). Diese ist sowohl von der Kontrolle ohne den Primärantikörper, als auch von der Kontrolle ohne Stimulation abgrenzbar.

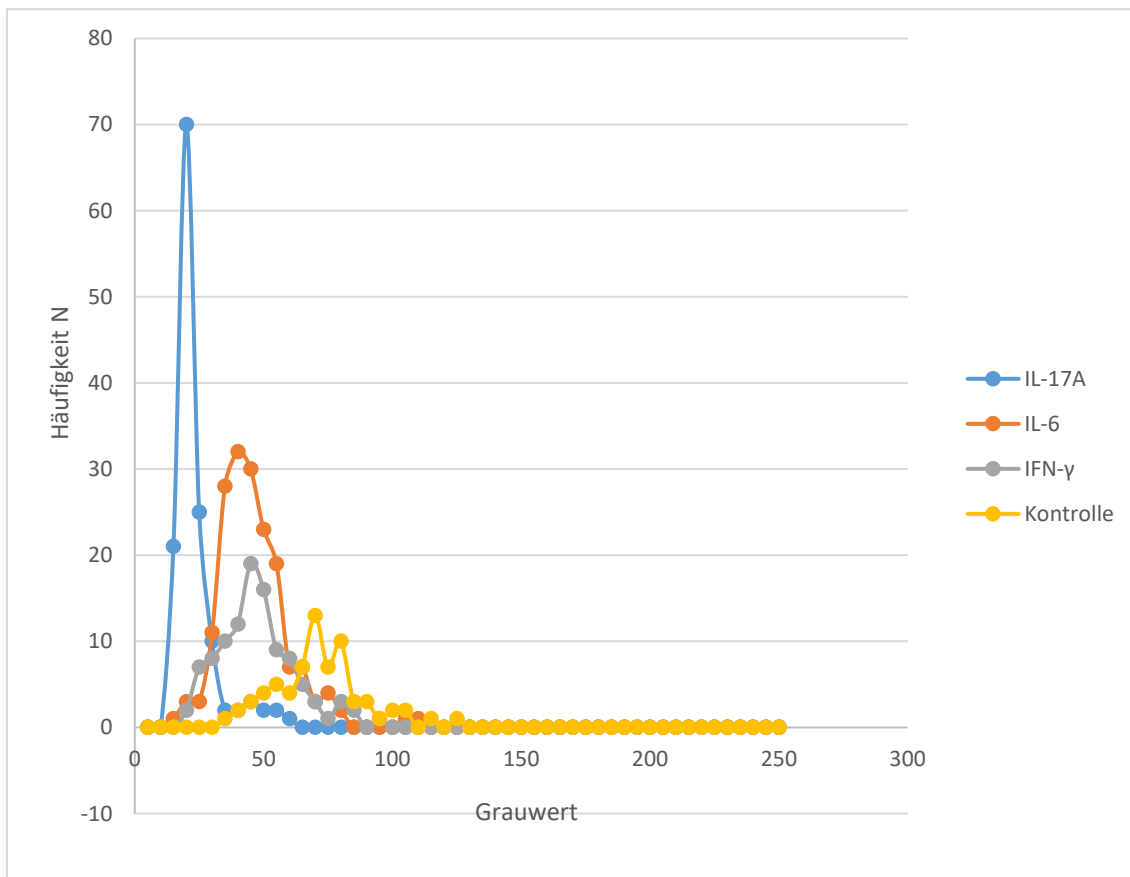
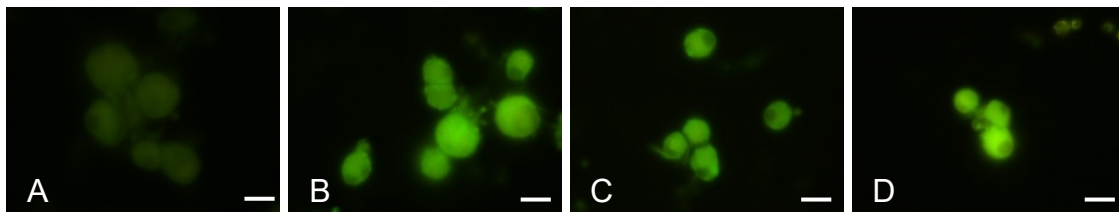


Abbildung 13 SOCS3 nach IFN- γ -Stimulation (Hungerperiode 3-4 Stunden). Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung der Grauwerte von DRG-Neuronen mit SOCS3-Markierung. Es ist jeweils eine Aufnahme in 400-facher Vergrößerung aus der Fluoreszenzmikroskopie von den entsprechenden Stimulationen abgebildet. DRG-Neurone mit hellem Zytoplasma erreichen auch höhere Grauwerte. Die Inkubation erfolgte einzeln mit IL-17A (200 ng/ml Bild A), IL-6 (50 ng/ml Bild B) und INF- γ (100 ng/ml Bild C). Die DRG-Kulturen hungerten 3-4 Stunden in DMEN. Die Stimulationen zeigen keine eindeutigen Tendenzen. Die Kontrolle (Bild D) ohne Stimulation hat sogar etwas höhere Grauwerte, während die IL-17A-Stimulation die geringsten Grauwerte hat. Eine verwertbare Kontrolle ohne Primärantikörper ist nicht vorhanden. Als Sekundärantikörper kam GAR-Alexa 488 (1:200) zum Einsatz. Maßstab 10 μ m.

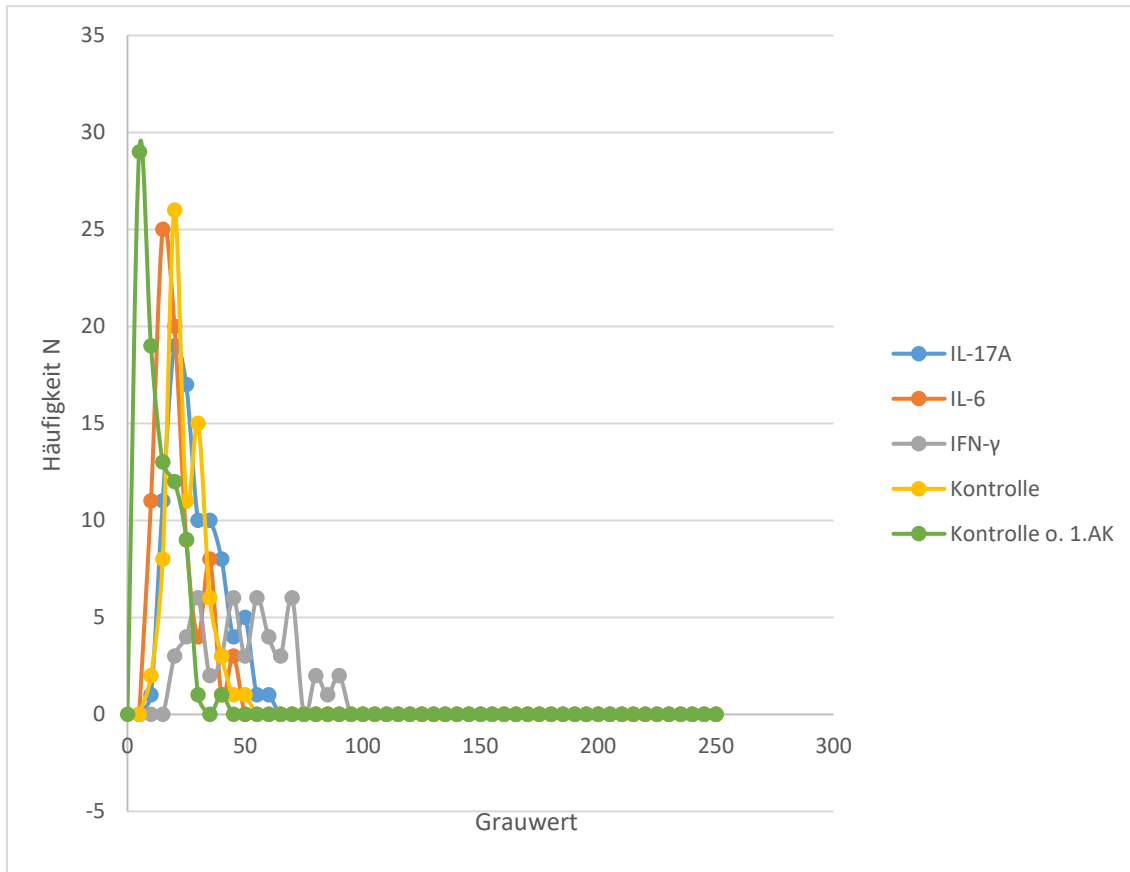
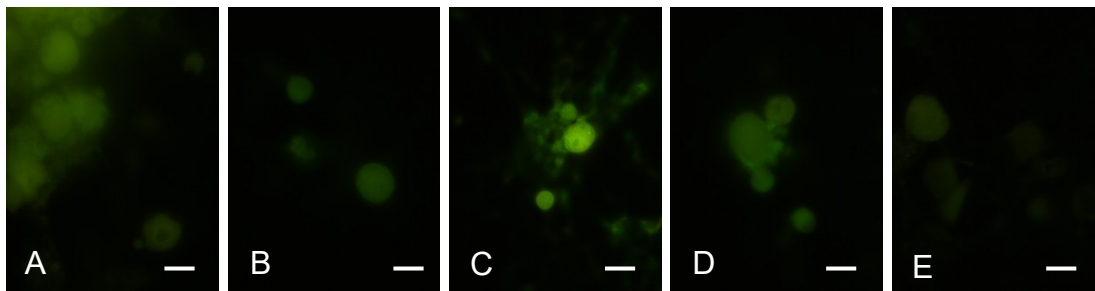


Abbildung 14 SOCS3 nach IFN- γ -Stimulation (Hungerperiode 48 Stunden). Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung der Grauwerte von DRG-Neuronen mit SOCS3-Markierung, die einzeln mit IL-17A (200 ng/ml Bild A), IL-6 (50 ng/ml Bild B) und INF- γ (100 ng/ml Bild C) inkubiert wurden. Von jeder Stimulation ist eine typische Aufnahme abgebildet. Die DRG-Kulturen hungerten diesmal 48 Stunden in DMEN. Auch hier zeigen sich keine großen Effekte. Jedoch fallen die DRG-Neurone nach IFN- γ -Stimulation mit einem helleren Zytoplasma und damit höheren Grauwerten im Vergleich zur Kontrolle (Bild D) etwas aus dem Rahmen. Es kann auch eine Kontrolle ohne den Primärantikörper (Bild E) mit dargestellt werden, die die geringsten Grauwerte aufweist. Als Sekundärantikörper kam GAR-Alexa 488 (1:200) zum Einsatz. Maßstab 10 μ m.

In der kombinierten Stimulation war kein Effekt einer stärkeren SOCS3-Induktion erkennbar (**Abbildung 15**). Weder IL-6+IFN- γ , noch IL-17A+IFN- γ können sich im Grauwert von der Kontrolle abheben. Es bleibt nur der Hinweis auf einen Effekt den IFN- γ auf SOCS-3 in diesem Versuchsaufbau haben könnte.

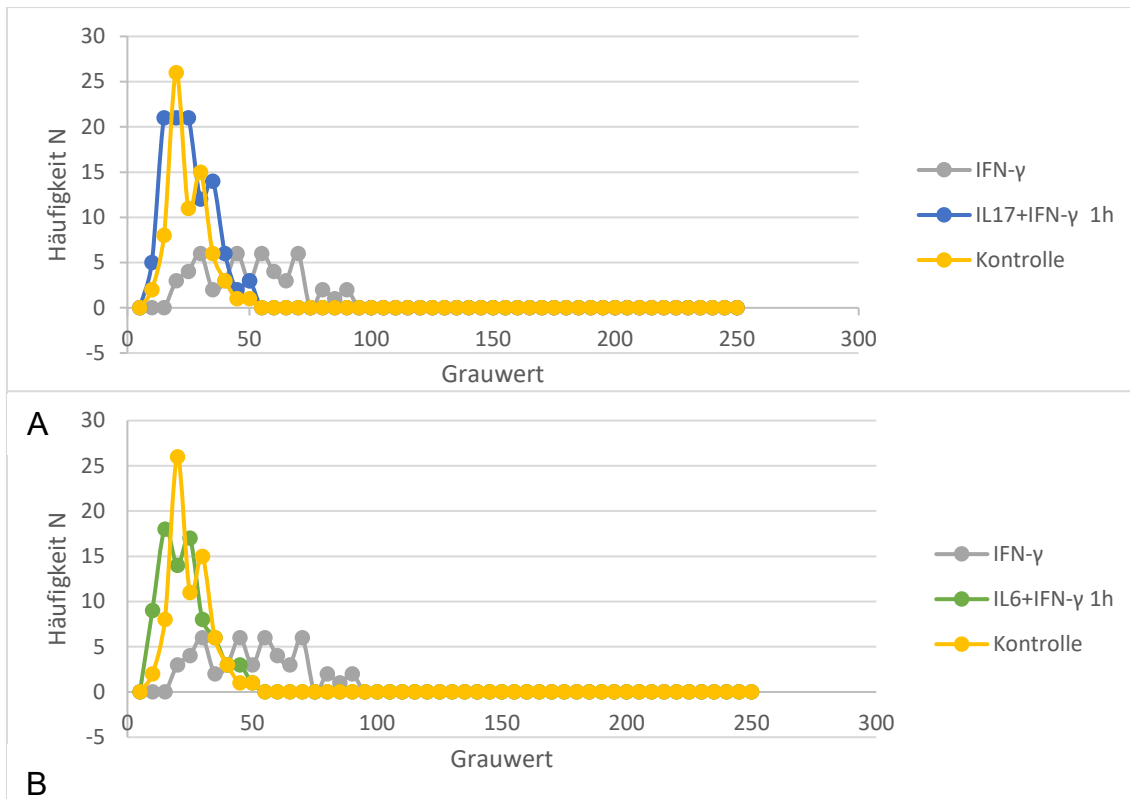


Abbildung 15 SOCS3 nach kombinierter Stimulation (Hungerperiode 48 Stunden). Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung der Grauwerte von DRG-Neuronen mit SOCS3-Markierung. Zur Stimulation wurde IFN- γ (100 ng/ml) jeweils mit IL-6 (50 ng/ml) oder IL-17A (200 ng/ml) kombiniert. Die DRG-Kulturen hungerten 48 Stunden in DMEN. **A** Während IFN- γ allein einen etwas höheren Grauwert aufweist, hebt sich dessen Kombination mit IL-17A nicht von der Kontrolle ab. **B** Auch in der Kombination mit IL-6 ist kein erhöhter Grauwert zu zeigen. Die Kontrolle ohne Primärantikörper ist der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt, entspricht aber dem entsprechenden Graphen in der vorherigen Abbildung.

5.4.2 Interferon- γ und SOCS3 in kultivierten Neuronen

Ausgehend von dem Vorversuch wurde eine Versuchsreihe (N=4 unabhängige Kulturansätze) mit IFN- γ gestartet. Die DRG-Neurone wurden nach einer Hungerperiode von 48 Stunden in DMEN für 1 Stunde mit IFN- γ (100 ng/ml) inkubiert. Es liefen eine Kontrolle ohne Stimulation und eine Allgemeinkontrolle ohne Primär- und Sekundärantikörper zum Einschätzen der Hintergrundfluoreszenz mit. Auch hier wurden die Grauwerte der DRG-Neurone nach ihrer Häufigkeit in Intervallen zu je 5 Grauwertpunkten angeordnet (**Abbildung 16**).

Dargestellt ist ein Beispiel für die Verteilung der Grauwerte von SOCS3-markierten DRG-Neuronen nach Stimulation mit IFN- γ (100 ng/ml). Dem wurde die Kontrolle (K) ohne Stimulation und die Hintergrundfluoreszenz (KM) ohne Antikörper gegenübergestellt. Es ist erkennbar, dass der Graph der Neurone, die mit IFN- γ

stimuliert wurden, gerade im höheren Grauwertbereich, über dem der Kontrolle liegt. Auch heben sich Kontrolle und Stimulation von der Hintergrundfluoreszenz ab. Ebenso ist erkennbar, dass die Grauwerte generell ein viel höheres Grundniveau als jene im Überblicksversuch haben. Das liegt höchstwahrscheinlich darin begründet, dass diesmal die Aufnahmen am Mikroskop bei fast kompletter Abdunkelung erfolgten, um das Umgebungslicht als potentielle Fehlerquelle zu minimieren. Es wurden verschiedene Kontrollen aus dem Überblicksversuch erneut unter den neuen Verhältnissen abfotografiert, um diese in dem Folgeversuch mit nutzen zu können. Es zeigte sich auch hier, dass die Grauwerte insgesamt höher ausfielen.

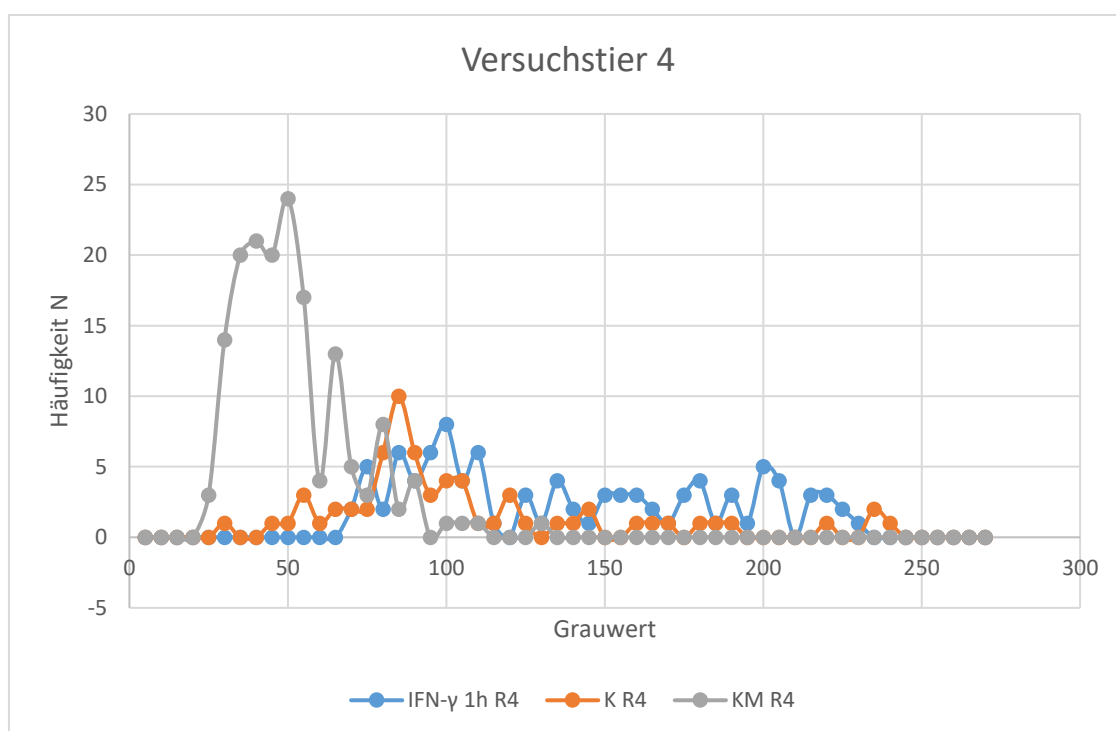


Abbildung 16 Grauwerte nach IFN- γ Stimulation. Dargestellt ist ein Beispiel für die Verteilung der Grauwerte von SOCS3-markierten DRG-Neuronen nach Stimulation mit IFN- γ (100 ng/ml). Dem wurden die Kontrolle (K) und die Hintergrundfluoreszenz (KM) gegenübergestellt. Es ist erkennbar, dass die Kurve der Neurone, die mit IFN- γ stimuliert wurden, gerade im höheren Grauwertbereich, über dem der Kontrolle liegt. Auch heben sich Kontrolle und Stimulation von der Hintergrundfluoreszenz ab.

Um die Häufigkeiten der Grauwerte der Versuchsreihe vergleichen zu können, wurde mit Hilfe der Vorversuche zu SOCS3 ein Grenzwert für den Grauwert festgelegt. Dazu waren Kontrollen nur mit dem Sekundärantikörper (GAR-Alexa488) durchgeführt worden. Die Grauwerte dieser Kontrollen zeigen das Spektrum der Fluoreszenz, die durch unspezifische Bindungen seitens des Sekundärantikörpers entstehen könnten.

Beim Vergleich der Sekundärantikörperkontrolle mit der Hintergrundfluoreszenz zeigte sich trotz Schwankungen im Grauwertniveau kein statistischer Unterschied ($p=0,253$, zweiseitiger t-Test). Dies spricht für eine gute Spezifität des Sekundärantikörpers (**Abbildung 17**).

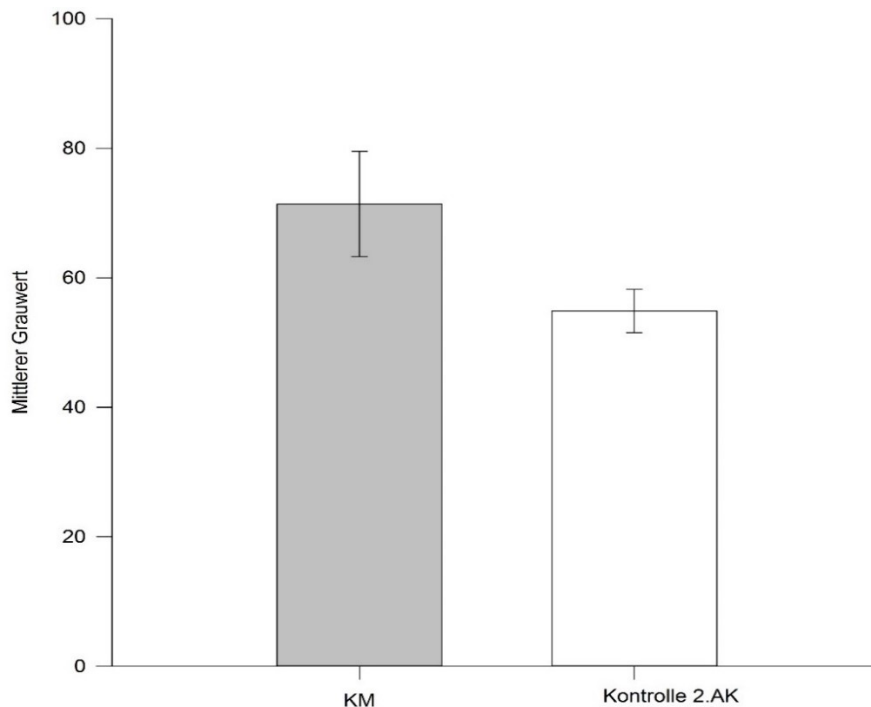


Abbildung 17 Vergleich Hintergrundfluoreszenz und Kontrolle Sekundärantikörper. Dargestellt ist der mittlere Grauwert der nativen DRG-Neurone (KM N=4 unabhängige Kulturansätze), welcher die Hintergrundfluoreszenz widerspiegelt. Im Vergleich dazu ist die Kontrolle aus den Vorversuchen, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde, abgebildet (N=2 unabhängige Kulturansätze). Auch wenn wider Erwarten die Hintergrundfluoreszenz einen höheren Grauwert hat, so ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Grauwerte \pm SEM. * $p<0,05$ (zweiseitiger t-Test)

Zur Ermittlung eines Grenzwerts wurde aus den Kontrollen mit dem Sekundärantikörper der maximale Grauwert gewählt. Zu diesem Wert wurden als Sicherheitsabstand noch 10 Grauwertpunkte hinzuaddiert. Auf diese Weise wurde ein Grenzwert von 173 ermittelt. DRG-Neurone der Versuchsreihe, die oberhalb dieses Wertes liegen, wurden als SOCS3-positiv angesehen (**Abbildung 18**).

Während visuell schon ein leichter Unterschied in der Fluoreszenz des Zytosols der DRG-Neurone zwischen der IFN- γ -Stimulation und der Kontrolle ausgemacht werden konnte, zeigte sich dieser deutlicher und objektivierbar im Vergleich der Grauwerte (**Abbildung 19**).

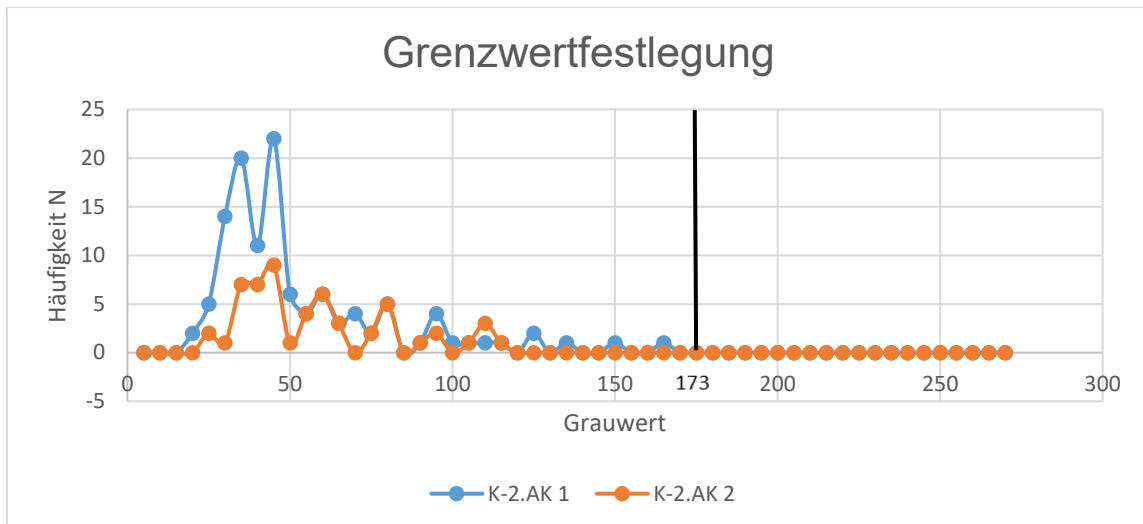


Abbildung 18 Grauwerte der Kontrollen ohne Primärantikörper. Dargestellt sind zwei Kontrollen, die nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden. Zur Festlegung des Grenzwerts wurde der Maximalgrauwert von 163 mit dem Sicherheitsabstand von 10 addiert. So ergibt sich der Grenzwert von 173.

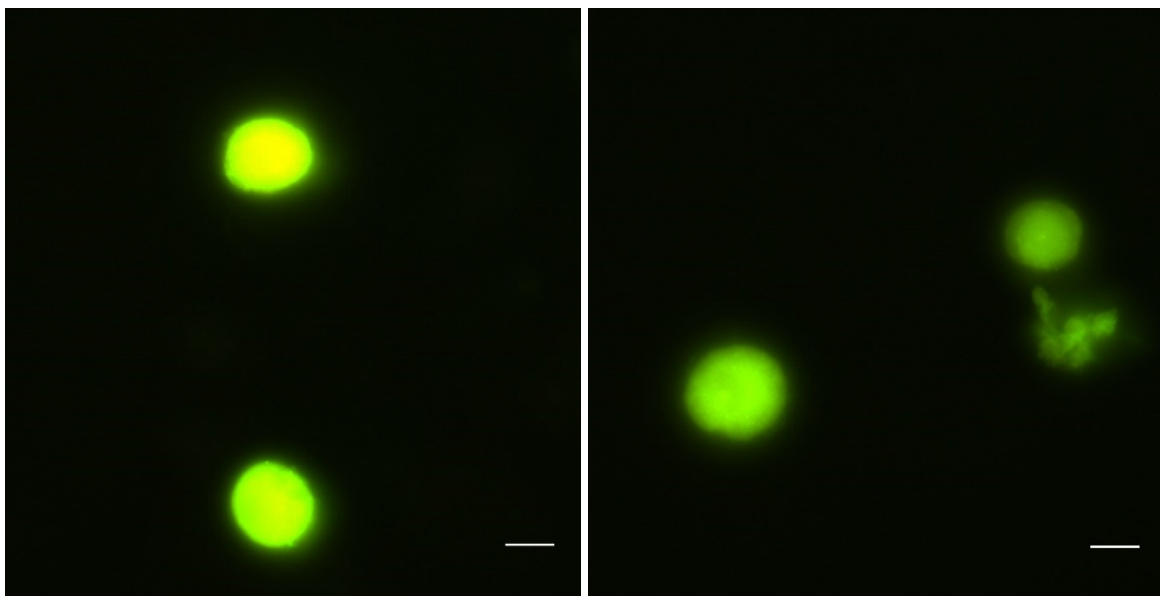


Abbildung 19 SOCS3-Markierung nach IFN- γ -Stimulation und Kontrolle. Dargestellt sind typische Bildausschnitte der Präparate in 400-facher Vergrößerung in der Fluoreszenzmikroskopie. Das Zytosol von den DRG-Neuronen der IFN- γ -Stimulation wirkt heller (links), als das der Kontrolle (rechts). Als Sekundärantikörper kam GAR-Alexa 488 (1:200) zum Einsatz. Maßstab 10 μ m.

In der Stimulation mit IFN- γ ließ sich zeigen, dass die Expression von SOCS3 über der der Kontrolle liegt (**Abbildung 20**). So hatten 27,2% der DRG-Neurone nach IFN- γ -Stimulation einen Grauwert, der höher als der Grenzwert von 173 war. Im Vergleich dazu lagen bei Abwesenheit von IFN- γ nur 11,7% der DRG-Neurone über diesem Grenzwert. Mit einem p-Wert von $p=0,018$ im zweiseitigen t-Test besteht statistische Signifikanz.

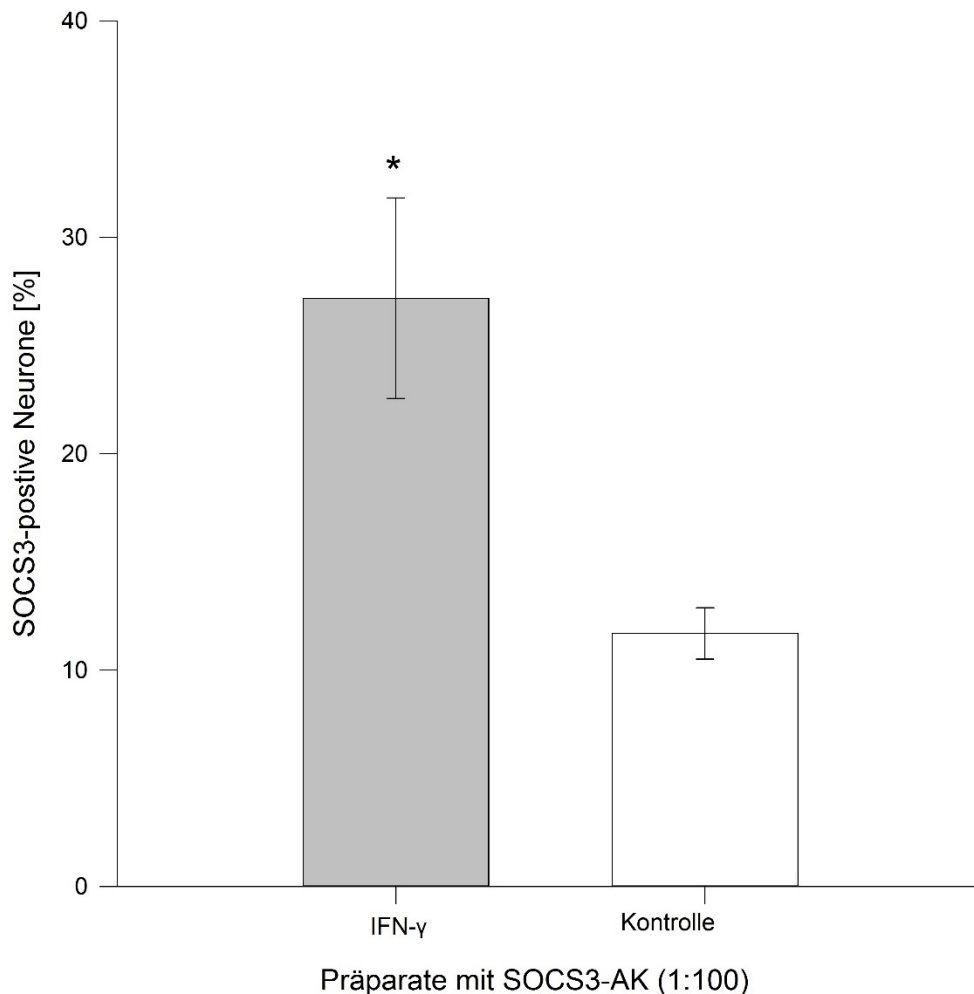


Abbildung 20 SOCS3 nach IFN- γ -Stimulation. Dargestellt ist die SOCS3-Expression mit und ohne IFN- γ -Stimulation (100ng/ml). IFN- γ ist in der Lage den intrazellulären SOCS3-Level zu erhöhen. Der SOCS3-Antikörper wurde 1:100 mit dem Antikörpermedium verdünnt. Die Versuchszahl beträgt N=4 unabhängige Kulturansätze. Aufgetragen ist das prozentuale Verhältnis der DRG-Neurone, deren Grauwert über dem Grenzwert liegt, zu denen, die darunter liegen \pm SEM. * $p < 0,05$ (zweiseitiger t-Test)

Ausgeschlossen werden musste, dass die DRG-Neurone der IFN- γ -Stimulation einfach generell einen höheren Grauwert haben als jene der Kontrolle. Beim Vergleichen der DRG-Neurone, die mit ihrem Grauwert über dem Grenzwert liegen, zeigte sich in deren Mittelwert kein großer Unterschied zwischen der Kontrolle mit 210,3 und der IFN- γ -Stimulation mit 203,0 (**Abbildung 21**). Im Mann-Whitney Rank-Sum Test, der aufgrund fehlender Normalverteilung der Werte durchgeführt wurde, zeigte sich mit einem p-Wert von $p = 0,114$ keine statistische Signifikanz für einen Unterschied beider Gruppen.

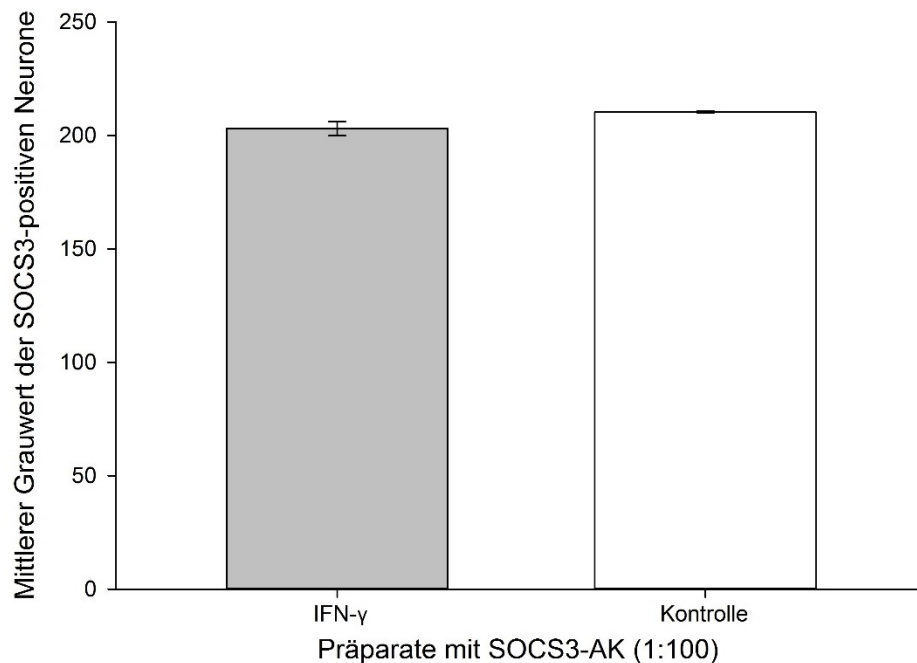


Abbildung 21 Mittlerer Grauwert SOCS3-positiver Neurone. Dargestellt ist der Mittelwert der Grauwerte von DRG-Neuronen, die als SOCS3-positiv gelten. Es besteht praktisch kein Unterschied zwischen der IFN- γ -Intervention (100 ng/ml) und der Kontrolle. Zusätzlich ist der \pm SEM aufgetragen. $p=0,114$ (Mann-Whitney Rank-Sum Test)

Daraus resultierten Überlegungen, dass eine bestimmte Population von DRG-Neuronen besonders stark auf IFN- γ mit einer SOCS3-Induktion reagiert. Aus diesem Grund wurde neben dem Grauwert als zweites Kriterium der Radius der DRG-Neurone in die Betrachtung eingeschlossen. Es wurden die Grauwerte mit dem dazugehörigen Radius der DRG-Neurone grafisch dargestellt (**Abbildung 22**). In den Streudiagrammen zeigt sich besonders eine Änderung der Grauwerte im Bereich mit mittlerer Größe von 8 μm . Die Bandbreite der DRG-Neurone liegt etwa bei einem Radius zwischen 2-18 μm .

Anhand dieser Bandbreite wurden die DRG-Neurone entsprechend ihrer Größe in vier Intervalle eingeteilt. Im ersten Intervall liegen DRG-Neurone mit einem Radius von 0-6 μm , im zweiten Intervall von 6-10 μm , im dritten von 10-14 μm und im letzten Intervall sind Neurone mit einem Radius >14 μm vertreten.

Tabelle 5 Größenverteilung SOCS3-positiver DRG-Neurone

Radius [μm]	IFN- γ (100 ng/ml) [%]	Kontrolle [%]
[0;6]	1,8	0
[6;10]	15,8	5,1
[10;14]	8,7	6,6
[14;18]	0,9	0

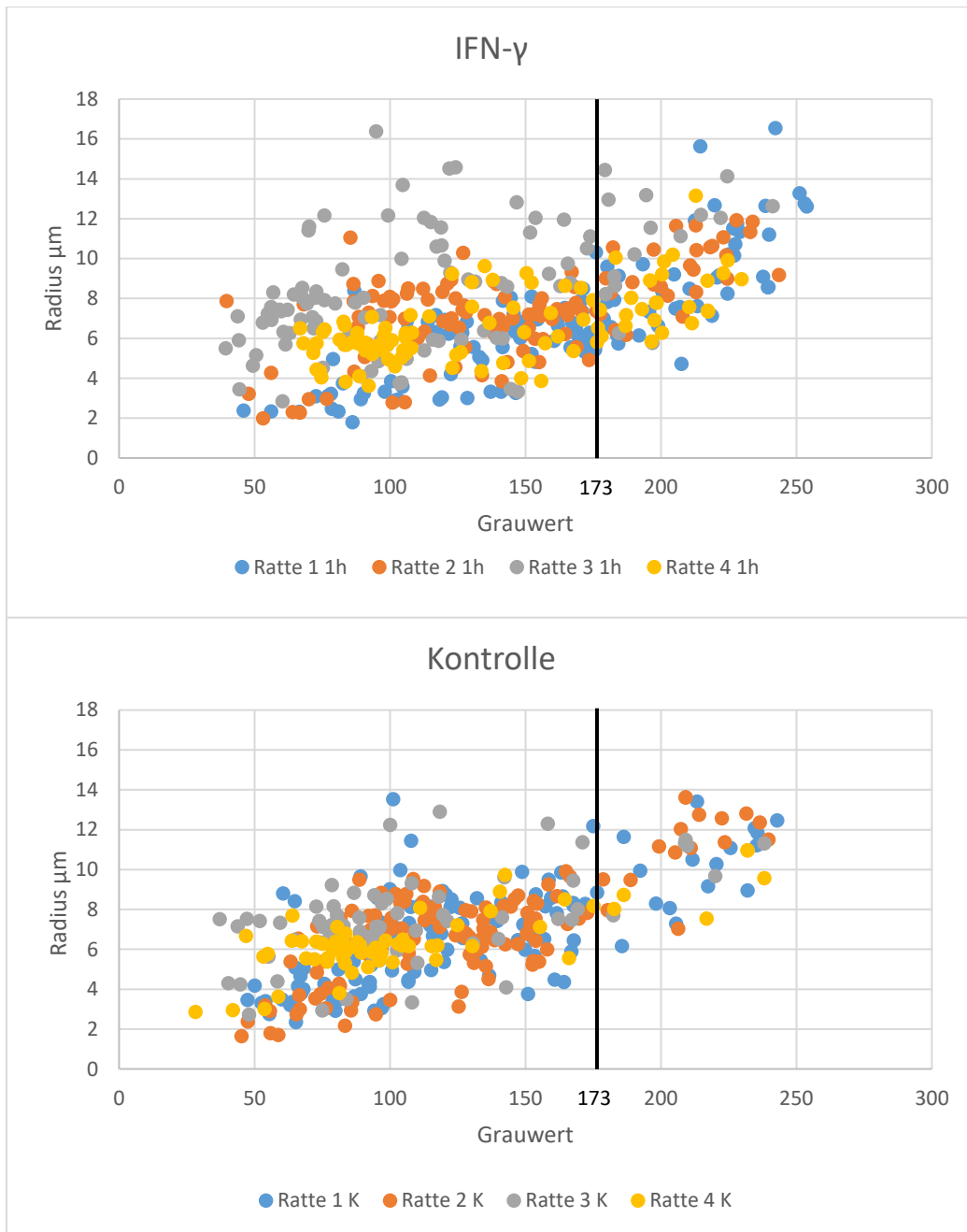


Abbildung 22 Größenverteilung der SOCS3-positiven DRG-Neurone. Dargestellt ist der Radius gegen den Grauwert der DRG-Neurone. Beim Vergleichen der Kontrolle (unten) mit der IFN- γ -Stimulation (oben) fällt auf, dass eine Verschiebung nach rechts besonders im mittleren Größenbereich bei 8 μm stattfindet und dass gerade dort Neurone den Grenzwert des Grauwerts überschreiten. Der senkrechte Balken kennzeichnet den Grenzwert von 173, ab dem die DRG-Neurone als SOCS3-positiv gezählt werden.

Wie in **Tabelle 5** zu sehen, ist der größte Zuwachs SOCS3-positiver DRG-Neurone im Radiusbereich zwischen 6 und 10 μm zu verzeichnen. Nach der Stimulation mit IFN- γ haben 15,8% der DRG-Neurone einen Grauwert größer als 173. Dem steht die Kontrolle mit 5,1% gegenüber. Der einseitige t-Test ist mit einem p-Wert von $p=0,029$ statistisch signifikant (**Abbildung 23**).

Gerade in diesem Größenintervall scheint eine Neuronenpopulation zu sein, die besonders auf IFN- γ mit einer SOCS3-Induktion reagiert. In den anderen Größenbereichen wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

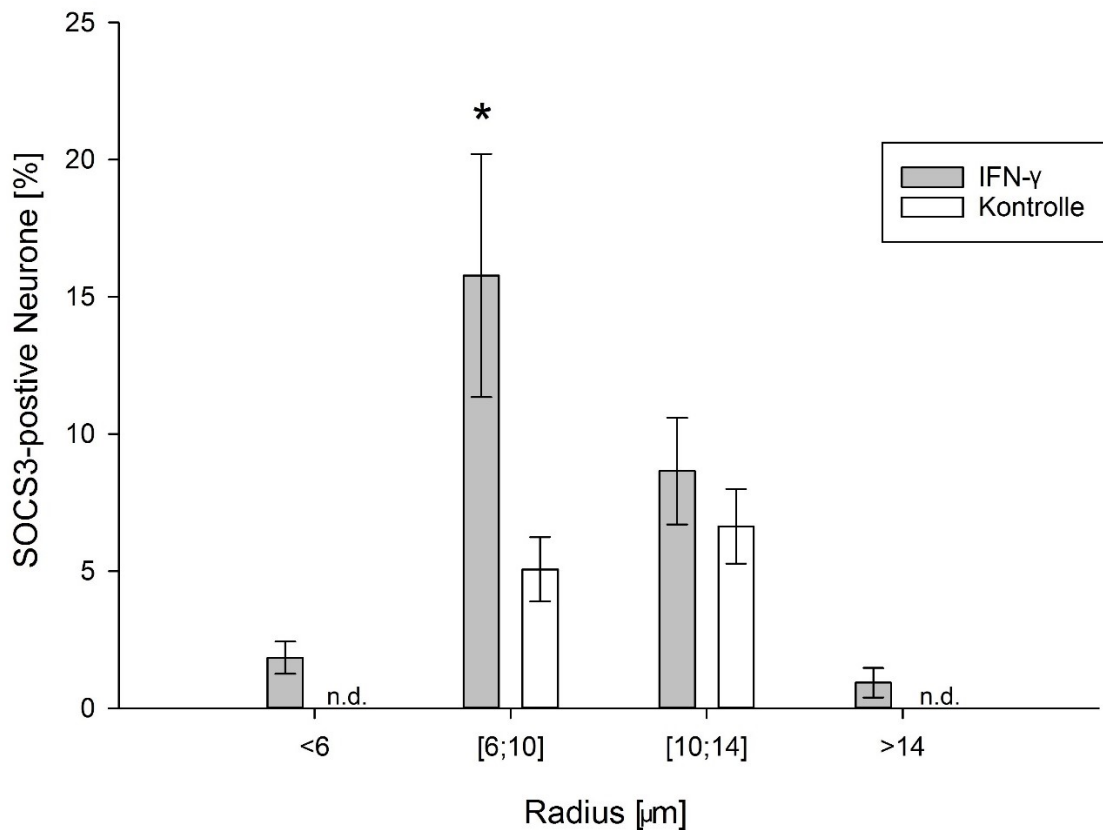


Abbildung 23 Größenverteilung SOCS3-positiver DRG-Neurone. Wenn die DRG-Neurone, die mit ihrem Grauwert über dem Grenzwert von 173 liegen, nach ihrer Größe betrachtet werden, so zeigt sich, dass im Bereich zwischen 6 und 10 μm wesentlich mehr auf IFN- γ reagieren als in den anderen Größenbereichen. Die Kontrollen im Bereich <6 und >14 μm waren unterhalb des Grenzwerts und daher nicht darstellbar (n.d.). Aufgezeichnet ist der prozentuale Anteil der SOCS3-positiven Neurone der IFN- γ -Stimulation und der Kontrolle \pm SEM. * $p < 0,05$ (einseitiger t-Test)

Zusammenfassend können folgende Aussagen getroffen werden: IFN- γ kann in DRG-Neuronen SOCS3 induzieren. Dieses Zytokin führt nicht in allen DRG-Neuronen gleichermaßen zu einer SOCS3-Hochregulation. Gerade DRG-Neurone mit einem Radius zwischen 6 und 10 μm sprechen stärker auf IFN- γ an. Im Gegensatz dazu gibt es Neurone, die im Ruhestoffwechsel bereits einen hohen Level an SOCS3 im Zytosol haben. Diese sind im Bereich von 6 bis 14 μm zu finden.

5.4.3 Interferon- γ und pSTAT3 in kultivierten DRG-Neuronen

Um zu überprüfen, ob IFN- γ auch pSTAT3 in DRG-Neuronen induzieren kann, wurden parallel zum SOCS3-Versuch DRG-Kulturen mit dem bereits verwendeten pSTAT3-

Antikörper inkubiert. Davor wurden die Kulturen mit Interferon- γ (100 ng/ml) für jeweils 15 und 30 Minuten stimuliert. Bei dem Versuchsaufbau lief eine Kontrolle mit, bei der auf die Stimulation verzichtet wurde.

Es ließ sich nicht zeigen, dass pSTAT3 durch IFN- γ in der DRG-Kultur induziert wird. Die Zellkerne, die eigentlich im positiven Fall vom Zytosol hell abgrenzbar sein sollten, lassen keinen Effekt erkennen, der es erlaubt hätte, eine quantitative Auswertung durchzuführen (**Abbildung 24**).

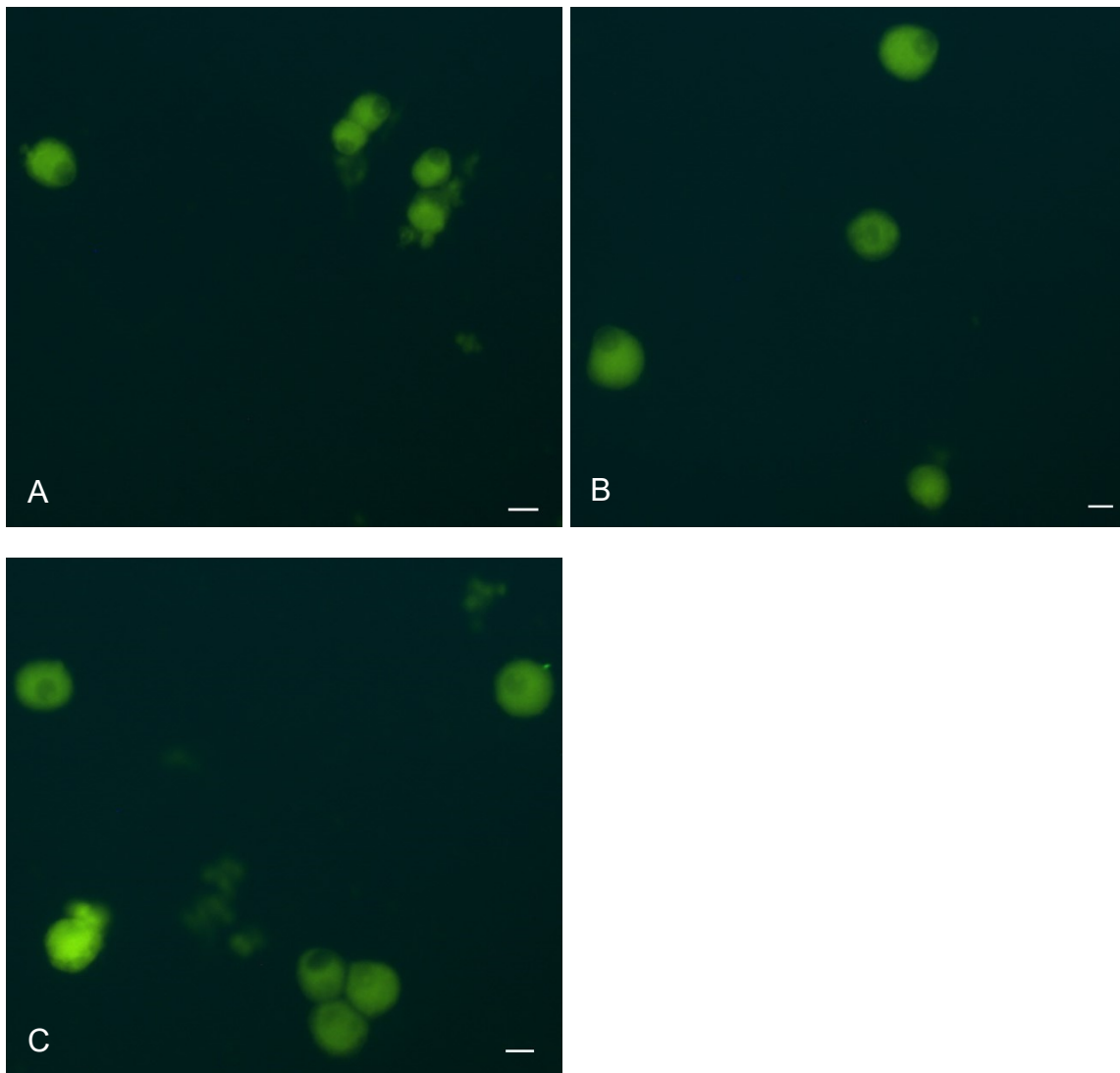


Abbildung 24 pSTAT3 nach IFN- γ -Stimulation. Abgebildet sind DRG-Neurone, die in der Kultur mit IFN- γ (100 ng/ml) für 15 Minuten (A) und 30 Minuten (B) inkubiert wurden. Nach der Markierung mit dem pSTAT3-Antikörper, erfolgte mit Hilfe des Sekundärantikörpers die Fluoreszenzmikroskopie. Es sind DRG-Neurone mit ihren Zellkernen zu sehen. Eine Anfärbung eben dieser Zellkerne ist nicht auszumachen und es zeigt sich kein Unterschied zur Kontrolle (C). Versuchszahl N=4 unabhängige Kulturansätze. Maßstab 10 μ m.

5.4.4 Interferon- γ und pSTAT3 im Western Blot

In der Zellkultur konnte nicht gezeigt werden, dass IFN- γ pSTAT3 hochreguliert, sehr wohl aber SOCS3. Ergänzend wurden deshalb Western Blots in der Arbeitsgruppe durchgeführt. Diese wurden von Dr. Christian König zur Verfügung gestellt. Es sollte überprüft werden, ob IFN- γ generell pSTAT3 nicht induziert und über einen anderen Signalweg SOCS3 hochreguliert oder ob es in einem so geringen Maß stattfindet, dass es in der Zellkultur von der Hintergrundfluoreszenz überlagert ist. Es wurden die Stimulationszeiten 1, 5, 15, 30, und 60 Minuten gewählt.

Nach der Stimulation mit IFN- γ (100 ng/ml) konnte eine leichte Intensitätszunahme der Banden schon nach einer Minute festgestellt werden. Die größte Signalstärke ist nach 15 Minuten erreicht worden (**Abbildung 25**). Die Ladekontrolle zeigt eine gleichmäßige Beladung der Geltaschen.

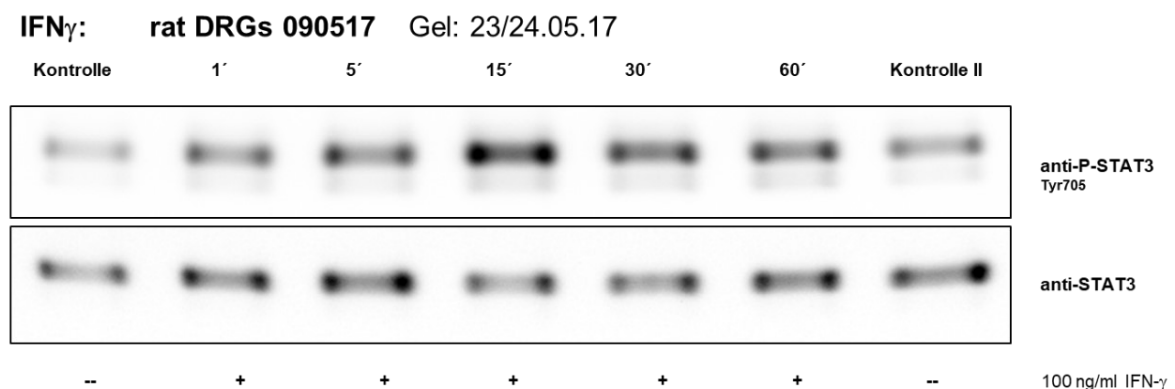


Abbildung 25 pSTAT3 und IFN- γ im Western Blot. Dargestellt ist in der oberen Reihe der pSTAT3-Antikörper und darunter die Ladekontrolle mit einem STAT3-Antikörper. Unter der Ladekontrolle ist die Zugabe von IFN- γ mit einem + gekennzeichnet. Gegen die Kontrolle sind die Zeitpunkte 1, 5, 15, 30, und 60 Minuten abgebildet. Die Intensität der Banden steigt leicht an und hat ihr Maximum nach 15 Minuten erreicht. Anschließend ist ein Abfall zu beobachten.

In weiteren Western Blots wurde neben IFN- γ (100 ng/ml) auch IL-6 (IL-6/sIL-6R 50 ng/ml) als Positivkontrolle zur Stimulation verwendet. Die Inkubation wurde mit den einzelnen Zytokinen und in Kombination durchgeführt (**Abbildung 26**).

Auch hier zeigte sich eine leichte Signalverstärkung nach der IFN- γ -Stimulation, die nach 15 bis 30 Minuten ihr Maximum erreichte. Wie eine starke Signalzunahme aussehen kann, ist in der Stimulation mit IL-6/sIL-6R zu beobachten. Über alle Banden hinweg war dieses starke Signal zu sehen. Die Kombination von IFN- γ und IL-6 zeigte ebenfalls ein starkes Signal über allen Zeitpunkten. Ein Unterschied zu der Einzelstimulation mit IL-6 war dabei nicht auszumachen.

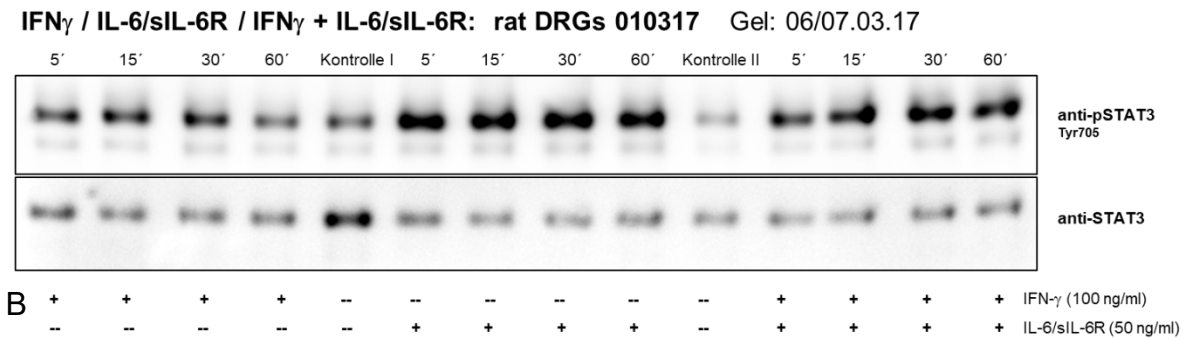
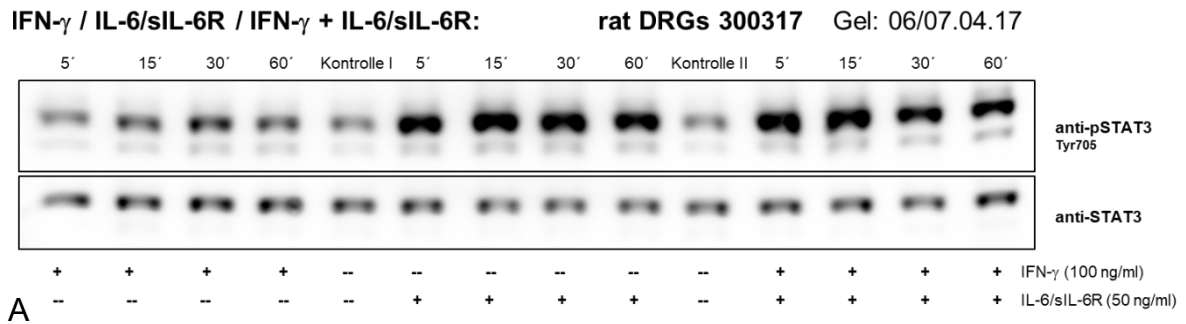


Abbildung 26 pSTAT3, IFN- γ und IL-6 im Western Blot. Dargestellt sind jeweils die Reihen mit Banden für pSTAT3 und STAT3. STAT3 bildet die Ladekontrolle, die zeigt, ob die Probestaschen mit der gleichen Menge Proteinlysate bestückt worden sind. Unter den Reihen sind jeweils die Zugaben mit einem + gekennzeichnet. **A** pSTAT3 reagiert auf IFN- γ mit einer leichten Signalverstärkung. Die Intensität, mit der pSTAT3 auf IL-6 reagiert, ist um ein Vielfaches höher. Ebenso führt die Kombinationsstimulation zu einem ähnlichen Ergebnis. **B** Dieser Western Blot unterstützt die bereits getroffenen Aussagen. Die Kombinationsstimulation wirkt etwas im Signal verringert im Vergleich zur IL-6-Stimulation. Die Ladekontrolle bei 5 Minuten ist aber mit weniger Protein beladen, als in der IL-6-Stimulation bei 5 Minuten. Es fällt auf, dass die Ladekontrolle bei Kontrolle I fehlerhaft mit zu viel Protein beladen wurde, weshalb das pSTAT3-Signal auch relativ hoch ist. Die Kontrolle II zeigt aber die korrekte Beladung.

Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass IFN- γ einen Einfluss auf den pSTAT3-Level in einer DRG-Kultur haben kann. Der Methode geschuldet, kann jedoch nicht gesagt werden, dass dies zwingend in den DRG-Neuronen geschieht. Ebenso könnte pSTAT3 in den Gliazellen hochreguliert werden. Davon abgesehen, ist die Hochregulation im Vergleich zu der IL-6-Inkubation wesentlich geringer. Beides sind mögliche Gründe, weshalb in der DRG-Kultur keine pSTAT3-Hochregulation auszumachen war. Eine Kombination von IFN- γ und IL-6 führt im Vergleich zur alleinigen IL-6-Stimulation zu einer vergleichbar hohen pSTAT3-Hochregulation.

6 Diskussion

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine IL-17A-Inkubation pSTAT3 in kultivierten DRG-Neuronen induzieren kann. In dem Modell der AIA konnte weder eine Spontanaktivität noch eine Dynamik in der pSTAT3-Aktivität beschrieben werden. Jedoch wurde pSTAT1 im Verlauf der AIA stark herunter reguliert. Der Inhibitor SOCS3 konnte durch IFN- γ induziert werden. Die Zytokine IL-6 und IL-17A zeigten in den Vorversuchen keinen eindeutigen Einfluss auf die SOCS3-Induktion, weshalb diese nicht weiterverfolgt wurden. Während in immunzytologischen Markierungen an kultivierten DRG-Neuronen IFN- γ keinen sichtbaren Einfluss auf die Bildung von pSTAT3 hatte, war im Western Blot eine leichte pSTAT3-Induktion sichtbar. IL-6 induzierte im Western Blot als Positivkontrolle sehr stark pSTAT3. Einen Überblick über diese Ergebnisse gibt **Abbildung 27**.

Eine 30-minütige IL-17A-Inkubation in DRG-Neuronen bedingt eine signifikante pSTAT3-Induktion (Vgl.5.1). IL-17A und pSTAT3 werden unabhängig voneinander in der Literatur mit der Entstehung von Schmerzen und Hyperalgesie auf Ebene der DRG- und Rückenmarksneurone in Verbindung gebracht (Ebbinghaus et al. 2017, Richter et al. 2012, Segond von Banchet et al. 2013, Shen et al. 2018, Xue et al. 2014, Yamauchi et al. 2006, Li et al. 2017, Donnerer und Liebmann 2011).

Es scheint eher nicht der Fall zu sein, dass IL-17A direkt auf JAKs wirken kann, um STAT3 zu phosphorylieren. Der IL-17A-Rezeptor wirkt hauptsächlich über Act1, eine Ubiquitin-Ligase, auf andere Signalwege wie zum Beispiel NF- κ B und MAPK (Hata et al. 2002, Hunter 2007, Liu et al. 2009). IL-17A kann proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF- α oder IL-6 induzieren und so indirekt, zumindest über IL-6, pSTAT3 aktivieren (Ma et al. 2018, Gu et al. 2011).

IL-1 β und TNF- α könnten aber auch über eine pSTAT3-Induktion in DRG-Neuronen zur Entstehung chronischer Schmerzen beitragen. Es sei angemerkt, dass diese Zytokine eigentlich nicht über den JAK/STAT3-Signalweg wirken. Es ist aber bekannt, dass in Osteoklasten beispielsweise IL-1 β und TNF- α ihre Wirkung auch über eine IL-6-Induktion und dessen Signalwege vermitteln (Li et al. 2017, Gabay et al. 2010, Wajant et al. 2003, Devlin et al. 1998).

IL-17A kann aber auch direkt zur Sensibilisierung von DRG-Neuronen beitragen, wenn IL-6 und TNF- α ausgeschaltet sind (Richter et al. 2012).

Da in dieser Arbeit IL-6 nicht ausgeschaltet wurde, ist es daher möglich, dass IL-17A seine pSTAT3-Induktion in der DRG-Kultur über eine IL-6-Induktion vermittelt.

Daneben wäre es aber auch denkbar, dass über den IL-17A-Signalweg auch direkt Interaktionen mit STAT3 vorhanden sind. So ist es beim IFN- γ -Signalweg. Dort kann STAT1 am Serin 727 durch ERK1/2 phosphoryliert werden (Herrera-Molina et al. 2012). Auch STAT3 kann JAK-unabhängig am Serin 727 durch ERK-MAPK phosphoryliert werden und dadurch in der Aktivität moduliert werden. In B-Zellen konnte gezeigt werden, dass STAT3 JAK-unabhängig am Tyrosin 705 durch das Protein Lyn, eine Tyrosinkinase, phosphoryliert werden kann (Chung et al. 1997b, Wang et al. 2006). In ähnlicher Weise wären JAK-unabhängige Phosphorylierungen von STAT3 beim IL-17A-Signalweg denkbar.

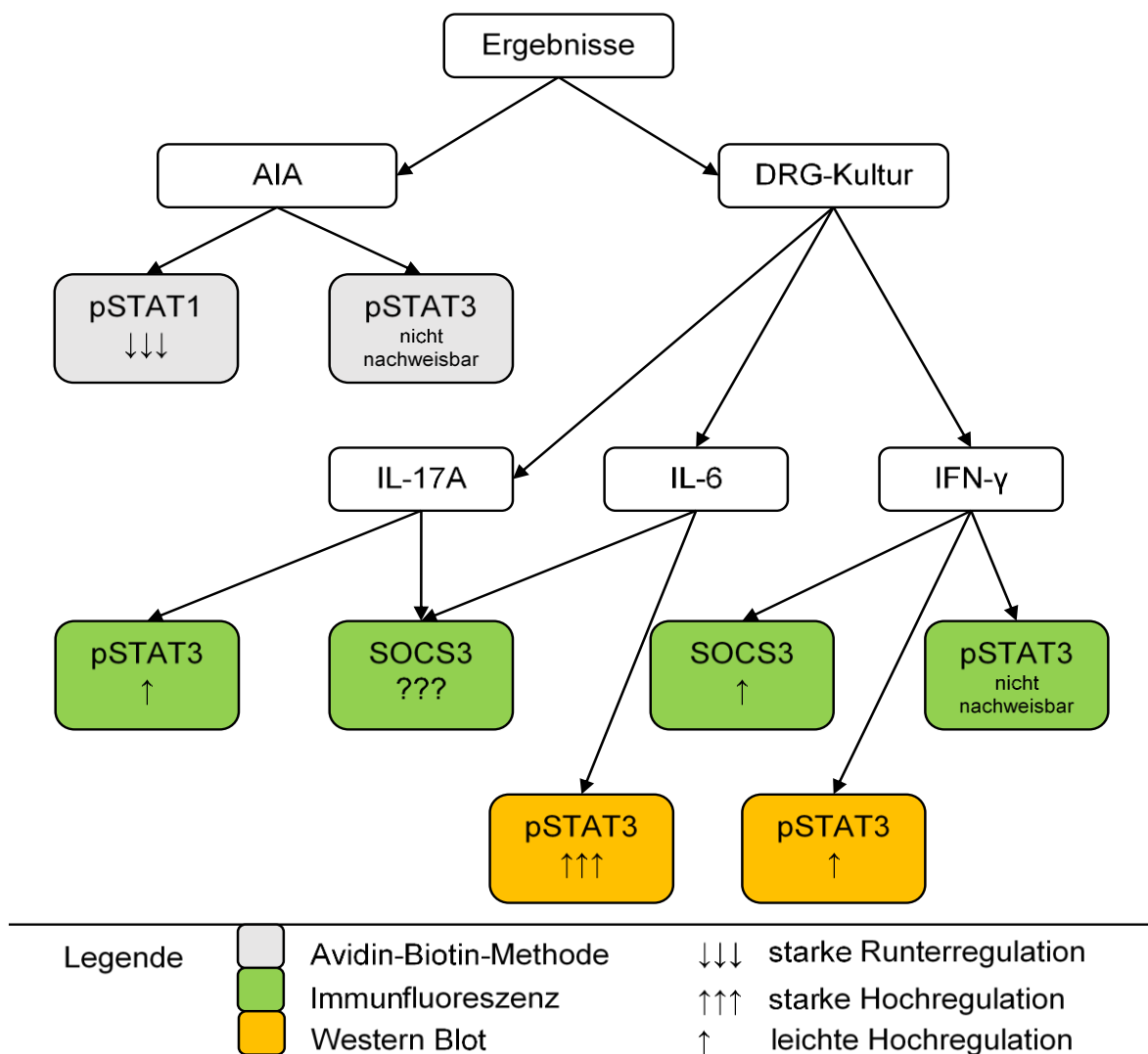


Abbildung 27 Ergebnisdarstellung

Des Weiteren gilt es zu bedenken, dass in der DRG-Kultur nicht nur nozizeptive, sondern auch andere somatosensible Neurone vorkommen. Es ist bekannt, dass die peripheren nozizeptiven Neurone eher die kleinen (Radius $<15\text{ }\mu\text{m}$ / Fläche $<707\text{ }\mu\text{m}^2$) und mittelgroßen ($15\text{-}20\text{ }\mu\text{m}$ / $707\text{-}1256\text{ }\mu\text{m}^2$) Neurone der DRG-Kultur sind. Zu diesen Neuronen gehören die nicht myelinisierten C- und die wenig-myelinisierten A δ -Fasern (Donnerer und Liebmann 2011, Holzer 1991, Ma 2002). Diese tragen auch die für die Nozizeption typischen TRPV1-Rezeptoren, welche zum Beispiel über Capsaicin aktiviert werden, aber auch TRPV4-Rezeptoren, welche eher mit IL-17A im Zusammenhang stehen (Schaible et al. 2010, Segond von Banchet et al. 2013). Ob pSTAT3 in der TRPV4-Induktion involviert ist, ist nicht bekannt.

In Bezug auf den IL-17A-Versuch wurde die Größe der Neurone nicht verglichen, weshalb sich keine sichere Aussage treffen lässt, ob pSTAT3 tatsächlich spezifisch in nozizeptiven Neuronen hochreguliert wurde. Der Erfahrung nach überstehen die größeren Neurone die Präparationsschritte wegen des größeren mechanischen Stresses schlechter als kleinere Neurone. Dies konnte auch in den SOCS3-Versuchen beobachtet werden (Vgl. 5.4.2). Von der Größe abgesehen, reagierte nur ein kleiner Anteil der DRG-Neurone auf IL-17A mit einer pSTAT3-Induktion, obwohl sich gezeigt hat, dass die meisten DRG-Neurone IL-17A-Rezeptoren tragen (Richter et al. 2012). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass nur eine Subpopulation der DRG-Neurone auf IL-17A mit einer pSTAT3-Induktion reagieren kann.

Methodisch ist anzumerken, dass die Präparate der DRG-Kultur in der Fluoreszenzmikroskopie unverblindet ausgezählt wurden. Als positive Zellkernanfärbung von Neuronen wurde gewertet, wenn der Zellkern sich in seiner Fluoreszenz erkennbar vom Zytoplasma abgrenzte. Bei nicht eindeutigen Anfärbungen wurde konservativ gezählt, also die Färbung als negativ gewertet. Auch waren auf wenigen Deckgläschen die Neurone nicht so zahlreich angewachsen. Das kann viele Gründe haben: Eine unzureichende Beschichtung mit Poly-L-Lysin, ein Herablösen durch Pipettiervorgänge und ein mögliches Antrocknen der Deckgläschen während der Inkubation. Im Mittel befand sich aber mit 160 Neuronen eine ausreichend große Zellanzahl auf den Deckgläschen der Präparate. Des Weiteren wurden die Aufnahmen der DRG-Neurone mit der optimalen Belichtungszeit erstellt, um mögliche Kernanfärbungen gut abgrenzen zu können. Daher konnte ein möglicher Anstieg von pSTAT3 im Zytoplasma nicht erfasst werden. Unterschiede im Grauwert

wären durch die verschiedenen Belichtungszeiten in diesen Aufnahmen nicht aussagekräftig.

Schlussfolgernd könnte IL-17A seine schmerzfördernde Wirkung in der AIA zumindest teilweise über pSTAT3 vermitteln, wenn auch möglicherweise über eine IL-6-Induktion als Zwischenschritt. Es ist auch möglich, dass die pSTAT3-Induktion nur eine supportive oder modulierende Rolle in der Schmerzwirkung von IL-17A spielt.

Entgegen der Erwartung, dass in der AIA pSTAT3 deutlich hochreguliert sein müsste, zeigte dieser Transkriptionsfaktor weder eine Aktivierung noch eine Dynamik über den Verlauf der AIA. Es konnte auch keine nennenswerte Grundexpression von pSTAT3 in der Kontrolle festgestellt werden. Gerade weil IL-17A einen Effekt auf pSTAT3 in der DRG-Kultur hat und IL-17A sowohl in der AIA und als auch in der rheumatoiden Arthritis vermehrt ausgeschüttet wird, wäre eine pSTAT3-Induktion erwartet worden (van Baarsen et al. 2014).

Mehrere mögliche Gründe stehen deshalb zur Diskussion: 1. Hat pSTAT3 in DRG-Neuronen der AIA keine Funktion? 2. Bilden die Zeitpunkte der AIA-Schnitte eine kurze und frühzeitige pSTAT3-Induktion nicht ab? 3. In der Zellkultur wurde gezielt mit einem Zytokin stimuliert. Im Gegensatz dazu wirken in der AIA sehr viele Zytokine gleichzeitig auf die DRG-Neurone. Verhindern die Zytokin-Interaktionen eine nennenswerte STAT3-Aktivierung?

In Modellen für chronische und neuropathische Schmerzen konnte gezeigt werden, dass eine STAT3-Aktivierung in Neuronen in deren Entstehung involviert ist. In diesen Modellen werden proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 als Ursache angesehen (Li et al. 2017, Shen et al. 2018, Yamauchi et al. 2006). In anderen Arthritismodellen als der AIA wirken Inhibitoren, die den JAK/STAT3 Signalweg hemmen, symptomverbessernd und verringern Entzündungszeichen. Nozizeptive DRG-Neurone waren jedoch in den oben erwähnten Tierexperimenten nicht untersucht worden (Ahmad et al. 2017, Guan et al. 2018, Kamel et al. 2018). Im AIA-Modell werden infolge der Immunantwort neben IL-17A unter anderem auch TNF- α , IL-1 β und IL-6 freigesetzt. Diese proinflammatorischen Zytokine können direkt oder indirekt auch auf den JAK-STAT3-Signalweg wirken (Schaible et al. 2010, Ebbinghaus et al. 2017, Devlin et al. 1998, Gu et al. 2011). Daher wäre es unwahrscheinlich, wenn

der JAK-STAT3-Signalweg in den DRG-Neuronen während der AIA komplett unbeeinflusst bliebe.

Die AIA-Schnittserien, die in diesem Versuch verwendet wurden, bestehen je aus 6 Schnitten. Am Tag 0 fand zwar die AIA-Induktion statt, aber bevor diese induziert worden war, wurden die Ratten bereits getötet. Die Ratten am Tag 0 waren lediglich bereits mit mBSA immunisiert worden. Damit ist der Tag 0 eine Art interne Kontrolle und es ergibt sich ein Zeitfenster von einem ganzen Tag, an dem theoretisch pSTAT3 nicht abgebildet wird. Somit besteht die Möglichkeit, dass pSTAT3 nur kurzzeitig in der Initialphase der AIA induziert wird. Da in der AIA mehrere Zytokine gleichzeitig auf diesen Signalweg wirken können, wäre sogar eine starke, kurze Hochregulation des Transkriptionsfaktors denkbar, ohne dass man sie in den AIA-Schnitten zeigen könnte.

Negative Feedback-Mechanismen könnten für eine kurze Dauer der pSTAT3-Induktion verantwortlich sein (Vgl. 3.2). Essenziell zur Regulierung von IL-6-induziertem pSTAT3 ist SOCS3. IL-6 kann aber auch SOCS1 und SOCS2 induzieren. SOCS3 sorgt zum einen für eine Limitierung des pSTAT3-Signals und zum anderen für eine spezifische IL-6-Antwort in der Gentranskription. In Leberzellen konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass in SOCS3-defizienten Zellen das pSTAT3-Signal wesentlich länger aktiv blieb. IL-6 induziert neben pSTAT3 auch etwas pSTAT1, welches aber ebenfalls durch SOCS3 negativ reguliert wird, sodass die STAT3-Antwort überwiegt. Reziprok verhält sich SOCS1, das unter anderem für eine spezifische IFN- γ -Antwort sorgt, indem es die STAT3-Wirkung, die auch IFN- γ erzielen kann, begrenzt. So überwiegt die STAT1-Antwort. Dabei bleibt aber zu bedenken, dass beide, SOCS3 und SOCS1, zur Regulation von IL-6 und IFN- γ beitragen können (Croker et al. 2003). Zudem ist über PIAS3 ein weiterer negativer Feedback-Mechanismus vorhanden, der spezifisch die pSTAT3-DNS-Interaktion hemmt (Chung et al. 1997a).

In der AIA wirken zum Beispiel TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-17A auf die Nozizeptoren. Dabei können sie direkt oder zumindest indirekt über eine IL-6-Induktion auf den JAK-STAT3-Signalweg wirken (Ebbinghaus et al. 2015, Richter et al. 2012, Schaible et al. 2010, Devlin et al. 1998, Gu et al. 2011). Eine hohe Anzahl an Interaktionen, die diese Zytokine auslösen, ist deshalb wahrscheinlich. Wenn alle diese Zytokine auf STAT3 wirken, könnte es zu einer ausgeprägten pSTAT3-Hochregulation kommen, die möglicherweise so rasant verläuft, dass das negative Feedback entsprechend stark

ausfällt und sich pSTAT3 innerhalb der ersten 24 Stunden wieder auf dem Level wie vor der AIA-Induktion befindet. Es ist somit nicht auszuschließen, dass mit einer initialen pSTAT3-Induktion die Weichen für eine länger anhaltende periphere Sensibilisierung gestellt werden. Untersuchungen über additive Effekte mehrerer Zytokine auf den STAT3-Signalweg sind bislang jedoch nicht beschrieben.

Eine weitere Möglichkeit, warum pSTAT3 in keinem der AIA-Schnitte nachweisbar war, wäre, dass dieser Transkriptionsfaktor zu instabil ist und während der Herstellung der Paraffinschnitte zerfällt. Dagegen spricht, dass diese Methode lange etabliert ist und sich andere Transkriptionsfaktoren sehr gut im Zellkern mit dieser Methode darstellen lassen (Segond von Banchet et al. 2016). Auch konnte pSTAT1 gut mit der Avidin-Biotin-Methode detektiert werden.

Im Gegensatz zu pSTAT3 zeigte pSTAT1 eine deutliche Dynamik in der AIA. Interessanterweise begann die signifikante Runterregulation von pSTAT1 bereits bevor die AIA-Induktion stattfand – also bereits am Tag 0. Zu diesem Zeitpunkt waren die Ratten lediglich mit mBSA immunisiert worden.

Mit dem Einsetzen der AIA bleibt der pSTAT1-Level erniedrigt und steigt erst mit dem Ausheilen der AIA wieder an, bis es am Tag 21 wieder die Höhe der Kontrolle erreicht hat. Damit gibt es Hinweise, dass ein niedriger pSTAT1-Level in DRG-Neuronen mit der Inflammation und Schmerzentwicklung im Verlauf der AIA assoziiert sein könnte. STAT1 wird klassischerweise von IFN- γ aktiviert, aber auch IL-6 kann diesen Transkriptionsfaktor induzieren (Costa-Pereira et al. 2002, Qing und Stark 2004, Bach et al. 1997). Beide Zytokine können in der AIA auf DRG-Neurone einwirken, wobei IFN- γ eher als protektiv und entzündungshemmend angesehen wird, da es in der AIA eine Art Gegenspieler von IL-17A darstellt (Ebbinghaus et al. 2015, Irmeler et al. 2007).

Dennoch wird pSTAT1 in DRG-Neuronen im Verlauf der AIA herunterreguliert. In Synovialfibroblasten und Immunzellen (T- und B-Lymphozyten) von Menschen mit RA zeigt sich hingegen eine deutliche STAT1-Aktivierung (Kasperkovitz et al. 2004, Walker et al. 2006). Andererseits konnte in einer Arbeit an Wistar-Ratten gezeigt werden, dass im Synovium der STAT1-Level vermindert ist und unter erfolgreicher Therapie wieder ansteigt (Zhang et al. 2015). Wichtig ist hier aber, dass in diesen Ratten die STAT1-mRNA („messenger ribonucleic acid“) gemessen wurde und keine Aussage zu aktiven pSTAT1 getroffen wurde. In einer weiteren Arbeit an Mäusen

konnte im Western Blot gezeigt werden, dass pSTAT3 in Lysaten der Gelenkschleimhäute über den ganzen Verlauf der Erkrankung erhöht war. Im Gegensatz dazu war pSTAT1 in der akuten Phase vermindert und erst in der chronischen Phase an den Tagen 14 und 21 erhöht. In diesem Tiermodell wurde die Arthritis mit dem Antigen Zymosan initiiert (de Hooge et al. 2004). In dem in dieser Arbeit verwendeten AIA-Modell ist der Tag 14 nicht untersucht worden, aber am Tag 7 ist bereits eine Tendenz zum Anstieg zu verzeichnen, der aber gegenüber Tag 3 noch nicht signifikant ist. Am Tag 21 ist pSTAT1 bereits wieder in so vielen DRG-Neuronen hochreguliert wie in der Kontrolle. Das lässt zumindest den Schluss zu, dass sich in der chronischen Phase über verschiedene Arthritismodelle hinweg etwas im Zytokinsignal ändern muss. Dennoch wurden verschiedene Gewebe als Experimentgrundlage genutzt und im Unterschied zu de Hooge et al. (2004) wurde in dieser Arbeit auch in der Kontrolle ein hohes pSTAT1-Signal festgestellt, aber zu keiner Zeit ein erhöhtes pSTAT3.

Das alles legt den Schluss nahe, dass in DRG-Neuronen negative Feedback-Mechanismen eine Rolle spielen müssen. Es gibt Arbeiten, die STAT3 und STAT1 reziproke Interaktionen attestieren (Vgl. 3.2.3). Eine ausgeprägte STAT3-Aktivierung könnte eine Herunterregulation von pSTAT1 über SOCS3 erklären (**Abbildung 3**). Ebenso könnte eine ausgeprägte pSTAT1-Induktion zum einen über SENP1 und PTP1B zur Dephosphorylierung von pSTAT3 und zum anderen über SOCS1 zu einem Abfall von pSTAT3 führen (Yu et al. 2017, Zhang et al. 2018, Baus und Pfitzner 2006). In DRG-Neuronen scheint dies aber nicht der Grund für die dauerhafte Erniedrigung von pSTAT1 während der AIA zu sein, weil pSTAT3, wenn überhaupt, nur in einem Zeitfenster von 24 Stunden zu Beginn der AIA oder eventuell während der mBSA-Immunisierung erhöht sein könnte. In der Literatur gibt es keinen Hinweis, dass eine kurzzeitige pSTAT3-Induktion langfristig pSTAT1 beeinflussen kann. Auch bleibt festzuhalten, dass pSTAT1 in DRG-Neuronen bereits auf die Immunisierung der Ratten reagiert hat, was wiederum nur sichtbar war, weil pSTAT1 in vivo eine hohe Grundexpression hat. Ob pSTAT3 durch die Immunisierungsschritte vor der AIA kurzzeitig reguliert wird, kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

Diese Überlegungen könnten folgendermaßen interpretiert werden: Im Normalzustand ist pSTAT1 in vielen DRG-Neuronen vorhanden. Da es in Bezug auf DRG-Neurone und STAT1 keine direkte positive Beziehung zu Schmerzen gibt, könnte pSTAT1 eher

solche Effekte haben, die einer peripheren Sensibilisierung entgegenwirken. Zum Beispiel könnte pSTAT1 die Transkription von SENP1 fördern und so, ähnlich wie in Makrophagen bereits gezeigt (Yu et al. 2017), ein pSTAT3-Transkriptionsprofil, das nachgewiesenermaßen schmerzfördernd wirken kann, eher hemmen. Mit der Immunisierung der Ratten vor der AIA-Induktion scheint sich irgendetwas an diesem Übergewicht von pSTAT1 zu ändern. Vielleicht bewirken die bei der Immunisierung ausgeschütteten Zytokine eine weitere STAT1-Aktivierung, was ab einem gewissen Punkt ein starkes negatives Feedback über SOCS1 auslösen könnte. In anderen Zellen konnte gezeigt werden, dass das von pSTAT3 gebildete SOCS3 neben pSTAT3 auch pSTAT1 inhibieren kann und so das Transkriptionsprofil von pSTAT3 spezifiziert. Auch über diesen Weg wäre ein pSTAT1-Abfall denkbar (Croker et al. 2003, Yu et al. 2017).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IFN- γ SOCS3 in DRG-Neuronen induzieren kann. Ein solcher Effekt war durch IL-6 oder IL-17A nicht zu detektieren. Spannend ist die Frage, ob SOCS3 eher STAT1 oder hauptsächlich STAT3 hemmt. In der Literatur wird SOCS3 wesentlich öfter mit STAT3 in Verbindung gebracht, was eventuell für eine stärkere Wirkung auf STAT3 spricht (Croker et al. 2003, Dominguez et al. 2010, Chaves de Souza et al. 2013, Lang et al. 2003). In der AIA wirkt IFN- γ eher antientzündlich und bei IFN- γ -Defizienz verläuft gerade die akute Phase der AIA mit der Folge einer erhöhten IL-17A-Antwort schwerer (Irmeler et al. 2007). Eine erhöhte IL-17A-Antwort könnte auch zu einer verstärkten mechanischen Hyperalgesie der Tiere führen (Ebbinghaus et al. 2017). Laborinterne Daten geben auch Hinweise, dass IFN- γ in der AIA eher eine anti-nozizeptive oder zumindest eine ambivalente Rolle spielt. Aus diesem Grund könnte das von IFN- γ induzierte SOCS3 einen Beitrag gegen eine periphere Sensibilisierung leisten und pSTAT3 niedrig halten.

Auch wenn eine ausgeprägte pSTAT3-Induktion in der AIA nicht sichtbar war, könnte ein kurzer pSTAT3-Impuls während der Immunisierung oder vor der AIA-Induktion dafür sorgen, dass sich das pSTAT1-Gleichgewicht ändert oder weiterhin verändert bleibt. Natürlich könnte STAT3 in diesem Prozess auch gar nicht involviert sein, sondern ein gänzlich anderer, hier nicht untersuchter, Signalweg. In **Abbildung 28** wurden diese Überlegungen grafisch dargestellt.

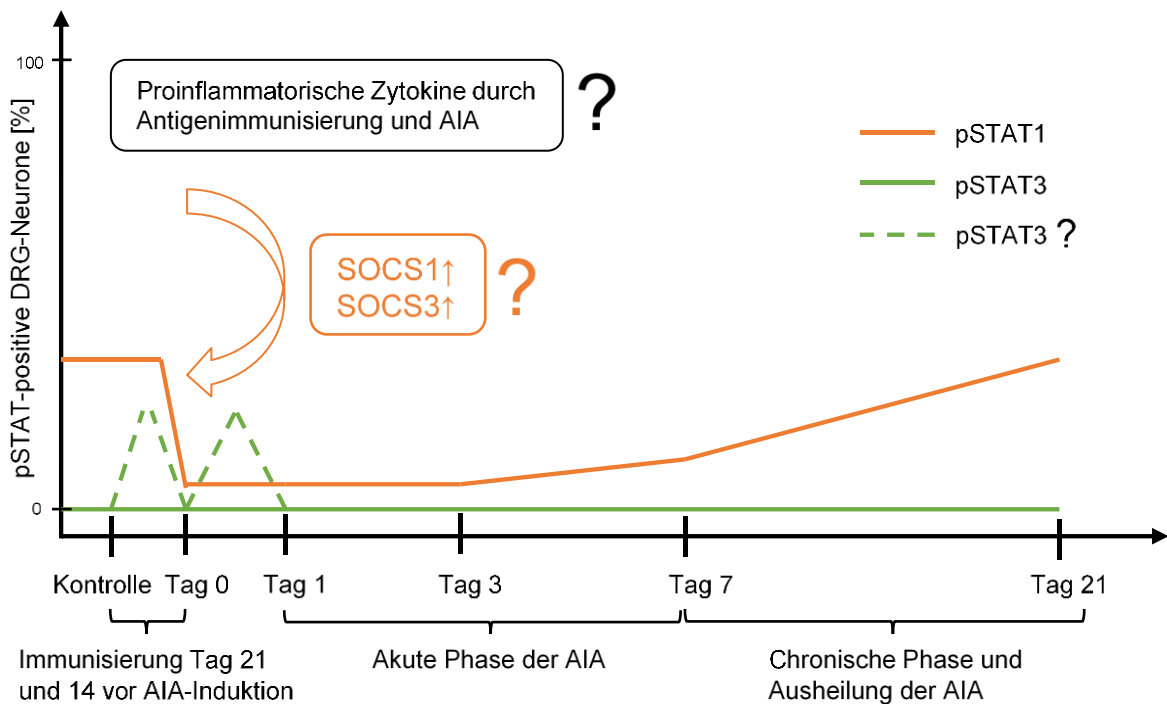


Abbildung 28 Überlegungen zu pSTAT1 und pSTAT3 in der AIA. Durch die Immunisierung der Ratten mit mBSA und mit dem Einsetzen der AIA sorgt ein Stimulus für einen Abfall des pSTAT1-Levels. Ein solcher Stimulus könnte durch proinflammatorische Zytokine gegeben sein. Diese könnten Einfluss auf SOCS1 und/oder SOCS3 haben. Beide SOCS könnten einen Beitrag zum Abfall von pSTAT1 leisten. Die Zytokine könnten zu einer weiteren pSTAT1-Induktion führen und damit eine Art überschwelliges negatives Feedback über SOCS erreichen oder kurzzeitig pSTAT3 induzieren, was zur Induktion der SOCS führen könnte. Der Einfluss des Stimulus scheint zwischen Tag 3 und Tag 7 zurückzugehen und pSTAT1 wird in immer mehr DRG-Neuronen wieder hochreguliert.

Es wurden bereits Ergebnisse der SOCS3-Versuchsreihe angerissen. In den Vorversuchen wurden IL-17A, IL-6 und IFN- γ in ihrer Wirkung auf eine SOCS3-Induktion untersucht. Gerade weil IL-17A und IFN- γ bereits im Zusammenhang mit der AIA als Gegenspieler bezeichnet wurden (Irmeler et al. 2007), sind auch Kombinationen zwischen IL-17A und IFN- γ und auch IL-6 und IFN- γ durchgeführt worden. Jedoch zeigte in der Zellkultur nur IFN- γ allein einen Effekt auf SOCS3 und das auch nur, nachdem die DRG-Neurone 48 Stunden in DMEN hungerten. In Stimulationen mit nur 3-4 Stunden im Hungermedium zeigten sich gar keine bis widersprüchliche Effekte. Wahrscheinlich war nach 3-4 Stunden der Zellstoffwechsel noch zu aktiv, um ein einheitliches SOCS3-Niveau in den Neuronen als Ausgangswert zu erreichen.

In der Versuchsreihe mit IFN- γ -Zugabe konnte gezeigt werden, dass IFN- γ SOCS3 in DRG-Neuronen signifikant induziert. Besonders Neurone mit einem Radius zwischen 6 und 10 μm reagieren derart. Interessanterweise konnte in der Zellkultur

keine pSTAT3-Induktion durch IFN- γ festgestellt werden. Nur im Western Blot ist ein leichter Anstieg von pSTAT3 zu beobachten gewesen. Vergleichend konnte im Western Blot ein starker pSTAT3-Anstieg nach einer IL-6-Stimulation festgestellt werden.

Folgende Sachverhalte werden im Folgenden diskutiert: 1. Wie ist die Induktion von SOCS3 durch IFN- γ in der Zellkultur einzuordnen? 2. Welche Rolle könnten IFN- γ und SOCS3 in der AIA spielen? 3. Warum ließ sich der Effekt auf SOCS3 nicht in der Kombinationsstimulation zeigen? 4. Welche Rolle spielt die Größe der Neurone, die eine SOCS3-Induktion zeigten? 5. Welche methodischen Einflüsse bestehen?

Eine Stimulation mit IFN- γ (100 ng/ml) konnte die SOCS3-positiven DRG-Neurone nach einer Stunde von 11,7% auf 27,2% ansteigen lassen. Das heißt, dass nach dieser Stimulation 27,2% der DRG-Neurone mit ihrem Grauwert über dem Grenzwert von 173 lagen. Ohne Stimulation lagen nur 11,7% der DRG-Neurone über diesem Grenzwert. Das IFN- γ SOCS3 induzieren kann, konnte bereits in verschiedenen Geweben in anderen Arbeiten gezeigt werden (Starr et al. 1997, Lang et al. 2003). Die reziproke Regulation von IL-6 und IFN- γ über SOCS1 und SOCS3 wurde bereits im Zusammenhang mit pSTAT3 und pSTAT1 diskutiert. Weiterführend steht SOCS3 vor allem mit der Limitierung der pSTAT3-Antwort im IL-6-Signalweg in Verbindung (Starr et al. 1997, Croker et al. 2003, Qing und Stark 2004). Wenn nun das von IFN- γ induzierte SOCS3 in DRG-Neuronen das pSTAT3 anderer Zytokine wie IL-6 oder IL-17A inhibieren würde, dann wäre das eine interessante Verknüpfung. So könnte IFN- γ einer möglichen Schmerzförderung von pSTAT3, das von proinflammatorischen Zytokinen induziert werden kann, entgegenwirken. Obwohl IFN- γ SOCS3 induziert, war in der Zellkultur keine pSTAT3-Induktion durch dieses Zytokin erkennbar. Nur im Western Blot war eine leichte pSTAT3-Induktion erkennbar, die aber auch von den nichtneuronalen Zellen der DRGs hätte kommen können. Im Gegensatz dazu konnte IL-6 im Western Blot ein sehr starkes pSTAT3-Signal erzeugen. In der Zellkultur wiederum konnte IL-6 wie auch IL-17A SOCS3 nicht merklich induzieren.

Eine Möglichkeit wäre, dass IFN- γ seine SOCS3-Induktion auch über eine anfängliche pSTAT3-Induktion erzielt. Jedoch müsste es dann einen Unterschied zwischen dem pSTAT3, was durch IFN- γ induziert und dem, was von IL-6 gebildet werden kann, geben. Unterschiede im Dimerisierungsmuster der STATs können prinzipiell durchaus unterschiedliche Wirkungen haben (Vgl. 3.2.3). Wenn das der Fall

wäre, könnte IFN- γ mit einer geringeren pSTAT3-Induktion wesentlich mehr SOCS3 bilden als IL-6. Interessant wäre auch die umgekehrte Herangehensweise. Kann IL-6 ein wesentlich höheres pSTAT3-Signal erzeugen, weil das über IL-6 aktivierte pSTAT3 weniger stark die Transkription von SOCS3 betreibt? Das von IFN- γ induzierte pSTAT3 könnte sich reziprok verhalten. Eine Arbeit von Starr et al. (1997) legt diese Überlegung nahe. In dieser Studie wurden Knochenmarkszellen mit Zytokinen stimuliert und anschließend der mRNA-Gehalt bestimmt. Es zeigte sich, dass, auf dieses Zellgemisch bezogen, IFN- γ ein höheres SOCS3-Signal erzeugte als IL-6. Ebendiese Arbeit zeigte auch, dass in M1-Makrophagen IL-6 stärker SOCS1 induziert als SOCS3. In Lebergewebe verhält es sich wiederum umgekehrt. Dies zeigt, dass Zellen und verschiedene Gewebe sehr unterschiedlich auf die gleichen Zytokine reagieren können (Starr et al. 1997).

Andererseits könnte IFN- γ auch über pSTAT1 SOCS3 induzieren. pSTAT1 und pSTAT3 können sich beide an die GAS („ γ -activated sequence“) des Promotors des SOCS3-Gens binden und so zur Transkription dieses Gens führen. In murinen Fibroblasten konnte eine höhere Affinität von pSTAT1 für das GAS des SOCS3-Promotors festgestellt werden (Qing und Stark 2004). In Verbindung mit der AIA ist gerade dieser zweite Ansatz interessant.

Wenn pSTAT1 auch in DRG-Neuronen ein starker Induktor von SOCS3 wäre, könnte dies erklären, warum pSTAT3 vor der AIA nicht detektierbar ist und pSTAT1 dominiert. In der AIA zeigt pSTAT1 einen rapiden Abfall, der schon mit der Immunisierung beginnt. Dadurch könnte auch SOCS3 abfallen. Warum pSTAT3 anschließend dennoch nicht merklich und dauerhaft ansteigt, kann nicht gesagt werden. Jedenfalls könnte eine positive Assoziation zwischen pSTAT1 und SOCS3 den antiinflammatorischen und eher schmerzhemmenden Aspekt von pSTAT1, der in dieser Arbeit favorisiert wird, unterstützen. In einer Arbeit von Dominguez et al. (2010) an Ratten konnte SOCS3 die mechanische Hyperalgesie in einem Modell für eine periphere Nervenschädigung verringern. Jedoch spielte hier die Blockade des JAK/STAT3-Signalwegs eine Rolle und es wurde das Hinterhorn des Rückenmarks und vor allem die Mikroglia betrachtet (Dominguez et al. 2010). Eine ältere Arbeit an Mäusen zeigte ebenfalls eine positive Wirkung von SOCS3 in den betroffenen Gelenken nach einer kollagen-induzierter Arthritis (Shouda et al. 2001). In der AIA könnten durch einen SOCS3-Abfall proinflammatorische Zytokine verstärkt

sensibilisierend auf DRG-Neurone wirken, ob nun indirekt oder direkt. Es sind Interaktionen von SOCS3 mit cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), p38 MAPK und indirekt mit NF- κ B bekannt. Diese Interaktionen könnten auch an einer peripheren Sensibilisierung beteiligt sein (Baetz et al. 2004, Yin et al. 2015, Bellezza et al. 2006, Chaves de Souza et al. 2013). Mit dem Ausheilen der AIA steigt die pSTAT1-Expression in den DRG-Neuronen wieder an. Möglicherweise erfolgt damit ein erneuter, hier nicht untersuchter SOCS3-Anstieg.

In der Zellkultur wurde die kombinierte Stimulation nicht weiterverfolgt, da sich keine Effekte auf SOCS3 in den Vorversuchen zeigten. Während IFN- γ allein SOCS3 induzieren kann, war dieser Effekt in der Kombination mit IL-6 oder IL-17A nicht auszumachen. Da die Versuchszahl in den Vorversuchen jeweils bei Eins lag, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, dass gar kein Effekt besteht. Jedoch ist der Unterschied zu IFN- γ deutlich.

Parallel dazu hatte eine IL-6 Stimulation im Western Blot ein starkes pSTAT3-Signal erzeugt. IFN- γ konnte in der Zellkultur gar nicht und im Western Blot nur ein schwaches pSTAT3-Signal induzieren. Die Kombination aus IL-6 und IFN- γ im Western Blot entsprach in der Größenordnung der pSTAT3-Hochregulation der einzelnen IL-6-Stimulation. Die Vermutung, dass die starke pSTAT3-Induktion von IL-6 mit einer eher geringen SOCS3-Induktion zusammenhängen könnte, wurde bereits geäußert. Die Zusammenführung der Ergebnisse aus den Western Blots und denen der Zellkultur könnte dafürsprechen, dass die Wirkung von IL-6 und wahrscheinlich auch von IL-17A der Wirkung von IFN- γ gegenübersteht und jene auch überwiegt, wenn eine kombinierte Stimulation stattfindet. Auch unter diesen Gesichtspunkten verwundert die fehlende Induktion von pSTAT3 in der AIA umso mehr.

In der SOCS3-Versuchsreihe wurde die Größe der SOCS3-positiven DRG-Neurone untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass vor allem Neurone mit einem Radius zwischen 6 und 10 μm mit einer SOCS3-Hochregulation infolge einer IFN- γ -Stimulation reagierten. Das sind vor allem die kleinen Neurone. Eine Arbeit von Haper und Lawson (1985) konnte einen positiven Zusammenhang zwischen der Neuronengröße und der Nervenleitgeschwindigkeit der zugehörigen Fasern zeigen. Die unmyelinisierten und damit langsam leitenden C-Fasern gehören zu den kleinsten DRG-Neuronen mit einer Größe von $442 \pm 148 \mu\text{m}^2$. Neurone mit A δ -Fasern haben eine Größe von $702 \pm 488 \mu\text{m}^2$. Die stark myelinisierten A β - und A α -Fasern gehören

zu Neuronen mit einer Größe von ca. $1142 \pm 366 \mu\text{m}^2$. Diese haben die höchste Nervenleitgeschwindigkeit. In der Schmerzweiterleitung spielen die C- und A δ -Fasern eine Rolle. Diese tragen zum Beispiel auch den für die Nozizeption typischen TRPV1-Kanal (Harper und Lawson 1985, Holzer 1991, Donnerer und Liebmann 2011).

In dieser Arbeit wurde der Radius als Größenparameter herangezogen. Da die Neurone in der Fluoreszenzmikroskopie eine annähernd runde Gestalt haben, lässt sich so aus einem Radius zwischen 6 und 10 μm eine Fläche von 113 bis 314 μm^2 errechnen. Demnach induziert IFN- γ SOCS3 in Neuronen, zu denen vor allem C-Fasern oder wegen der großen Standardabweichung A δ -Fasern gehören. Schlussfolgernd wird SOCS3 tendenziell eher in nozizeptiven Neuronen durch IFN- γ induziert.

In Gelenken reagieren die Nervenendigungen von A δ - und C-Fasern vor allem auf schädliche, unphysiologische Krafteinwirkungen. Ein nicht unwesentlicher Anteil der C-Fasern gehört zu den sogenannten schlafenden („silent“) Nozizeptoren. Diese reagieren erst bei Inflammation mit einer Reizantwort. Entzündungsmediatoren tragen zur Rekrutierung dieser schlafenden Nozizeptoren bei. Schädliche mechanische Stimuli reichen dafür allein nicht aus. Auf diese Weise haben diese Nozizeptoren Anteil an der Entstehung mechanischer Hyperalgesie in inflammatorischem Gewebe (Schaible et al. 2009, Schaible et al. 2010, Schaible und Schmidt 1988). Laborinterne, unveröffentlichte Daten von Nervenfaserableitungen zeigen, dass eine IFN- γ -Stimulation von C-Fasern zu einer verringerten Reizantwort führt. In A δ -Fasern führt es hingegen zu einer Reizzunahme. Diese Ergebnisse passen zu der etwas ambivalenten Rolle von IFN- γ und Schmerzentstehung.

Wenn die SOCS3-Induktion in DRG-Neuronen nach einer IFN- γ -Stimulation vor allem in C-Faserneuronen stattfinden würde, könnte dies ein Mechanismus sein, der zu der verringerten Reizantwort der C-Faserneurone führt und so für eine schmerzhemmende Wirkung von SOCS3 spricht.

Methodisch hatten die SOCS3-Versuche einige Schwierigkeiten. Zum einen wurde in den Vorversuchen die Hungerperiode in DMEN von 3-4 Stunden auf 48 Stunden wesentlich verlängert. Ziel war es den Zellstoffwechsel weiter herunterzufahren, da der Eindruck bestand, dass SOCS3 nach 3-4 Stunden immer noch sehr aktiv war. Das äußerte sich im Vergleich zu den Interventionen in relativ hellen Kontrollen. Andererseits wurde festgestellt, dass die Grauwertbestimmung in der

Fluoreszenzmikroskopie anfällig für Umgebungslicht ist. Die beiden Vorversuche wurden über verschiedene Tageszeiten hinweg abfotografiert. Trotz der Schwankungen, die sich auch in dem Vorversuch mit 48 stündiger Hungerperiode zeigten, konnte IFN- γ dort einen Effekt erzielen. Wegen der besagten Gründe wurden die Präparate der IFN- γ -Versuchsreihe morgens zur gleichen Uhrzeit bei höchstmöglicher Abdunkelung abfotografiert, da sich das Umgebungslicht sonst nur begrenzt kontrollieren ließ. Auch die Kontrollen ohne den Primärantikörper, mit denen der Grenzwert festgelegt worden war, wurden unter diesen Bedingungen erneut abfotografiert. Diese waren anschließend im Mittelwert ca. 20 Grauwertpunkte heller. In den Vorversuchen könnten schwache Effekte zum Beispiel von IL-6 durch die noch nicht eingedämmten Umgebungseinflüsse maskiert gewesen sein. Wenn dies der Fall wäre, dann würde die Wirkung dieser Zytokine dennoch weniger stark sein, als von IFN- γ . Eine Positivkontrolle mit IL-6 und gegebenenfalls IL-17A könnte unter den erwähnten Bedingungen Klarheit verschaffen.

In der Zellkultur wurde der Effekt von IFN- γ auf pSTAT3 untersucht. Da der pSTAT3-Antikörper bereits in anderen Versuchen erfolgreich eingesetzt wurde, kann ausgeschlossen werden, dass der Antikörper nicht richtig bindet. Im Western Blot war auch nur eine leichte pSTAT3-Induktion zu beobachten. Diese geringe Induktion, die auch in nicht-neuronalen Zellen hätte stattfinden können, wäre in der Immunfluoreszenz kaum zu detektieren. Das erklärt die fehlende pSTAT3-Induktion in der Immunfluoreszenz.

Die Western Blots, die von Dr. Christian König angefertigt wurden, sollen unterstützend wirken, da sie für sich allein keine ausreichend hohe Versuchszahl aufweisen (IFN- γ : N=3 unabhängige Kulturansätze und IL-6: N=2 unabhängige Kulturansätze). Die Tendenzen sind jedoch deutlich und bei entsprechender Versuchszahl wäre ein statistisch signifikantes Ergebnis sehr wahrscheinlich.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Von allen dargelegten Ergebnissen ist die Herunterregulation von pSTAT1 im Verlauf der AIA am eindeutigsten. Im Normalzustand ist pSTAT1 in einem Drittel der DRG-Neurone induziert. Die physiologische Bedeutung des pSTAT1-Abfalls könnte sein, dass der Körper bei aktiver Immunabwehr empfindlicher wird und damit auch die DRG-Neurone durch Schmerzreize leichter sensibilisiert werden können.

Die Immunreaktion auf mBSA, bevor die AIA induziert wird, reicht anscheinend aus, um pSTAT1 in DRG-Neuronen zu beeinflussen. Dass eine Immunreaktion eine systemische Wirkung auf das nozizeptive System entfalten kann, zeigen normale Impfungen. Diese können zum Beispiel zu Abgeschlagenheit und Gliederschmerzen führen. Damit erscheint die Überlegung, dass eine einfache Immunreaktion auf ein Antigen sich bereits generalisiert auf DRG-Neurone auswirkt, gar nicht abwegig. Dadurch könnte erreicht werden, dass ein Organismus sich schneller erschöpft fühlt, zum Beispiel im Sinne von Gliederschmerzen und sich schont.

Es wurde versucht, die weiteren Ergebnisse einzubinden. Die fehlende Induktion von pSTAT3 in der AIA ist der am wenigsten erwartete Befund dieser Arbeit, auch wenn mögliche Lösungsansätze benannt wurden. Es gibt zwar viele Arbeiten, die sich mit den STATs beschäftigen, aber da deren Effekte ein weites Spektrum haben und je nach Zellart auch verschieden zu reagieren scheinen, sind letzten Endes diese Lösungsansätze Mutmaßungen, die weiterer Forschung bedürfen.

Gerade weil pSTAT1 so deutlich im Zuge der AIA reagiert hat, würde es sich lohnen den Beginn der AIA genauer zu untersuchen. Vielleicht spielt eine pSTAT3-Induktion dort eine Rolle. Weiterführend wäre es interessant das Verhalten von SOCS3 und SOCS1 in der AIA zu erforschen, um die Rolle von STAT1 und STAT3 besser einordnen zu können. Spannend wäre es zu überprüfen, ob SOCS3 in der AIA positiv mit pSTAT1 korreliert.

Wenn in der akuten Phase der AIA mit dem Abfall von pSTAT1 ein Anstieg von SOCS1 stattfinden sollte, wäre die Wirkung verschiedener proinflammatorischer Zytokine auf SOCS1 in der Zellkultur eine Untersuchung wert. Wenn proinflammatorische Zytokine SOCS1 induzieren würden, könnte SOCS1 eine Rolle im pSTAT1-Abfall während der AIA spielen.

Des Weiteren könnten die DRG-Neurone, die in der AIA pSTAT1 exprimieren auf ihre Größe hin untersucht werden. Vielleicht ließe sich die pSTAT1-Dynamik im Verlauf der AIA auf eine bestimmte Neuronenpopulation zurückführen.

Diese Arbeit trägt dazu bei, das Zusammenspiel von Zytokinen mit intrazellulären Prozessen in DRG-Neuronen besser zu verstehen. Auf lange Sicht könnten sich daraus neue Perspektiven entwickeln, einer ungewollten peripheren Sensibilisierung von DRG-Neuronen entgegenzuwirken.

8 Literaturverzeichnis

- Ahmad SF, Ansari MA, Nadeem A, Zoheir KMA, Bakheet SA, Alsaad AMS, Al-Shabanah OA, Attia SM. 2017. STA-21, a STAT-3 inhibitor, attenuates the development and progression of inflammation in collagen antibody-induced arthritis. *Immunobiology*, 222 (2):206-217.
- Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, Corbin JE, Cornish AL, Darwiche R, Owczarek CM, Kay TW, Nicola NA, Hertzog PJ, Metcalf D, Hilton DJ. 1999. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell*, 98 (5):597-608.
- Azizi G, Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. 2013. Th17 Cells in immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*, 16 (3):243-253.
- Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. 1997. The IFN γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual Review of Immunology*, 15 (1):563-591.
- Baeten D, Peene I, Union A, Meheus L, Sebbag M, Serre G, Veys EM, De Keyser F. 2001. Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium: relevance to antifilaggrin autoantibodies. *Arthritis Rheum*, 44 (10):2255-2262.
- Baetz A, Frey M, Heeg K, Dalpke AH. 2004. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate Toll-like receptor signaling in innate immune cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (52):54708-54715.
- Banerjee S, Biehl A, Gadina M, Hasni S, Schwartz DM. 2017. JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects. *Drugs*, 77 (5):521-546.
- Baris S, Alroqi F, Kiykim A, Karakoc-Aydiner E, Ogulur I, Ozen A, Charbonnier LM, Bakir M, Boztug K, Chatila TA, Barlan IB. 2016. Severe early-onset combined immunodeficiency due to heterozygous gain-of-function mutations in STAT1. *J Clin Immunol*, 36 (7):641-648.
- Baus D, Pfitzner E. 2006. Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. *International Journal of Cancer*, 118 (6):1404-1413.
- Bellezza I, Neuwirt H, Nemes C, Cavarretta IT, Pühr M, Steiner H, Minelli A, Bartsch G, Offner F, Hobisch A, Doppler W, Culig Z. 2006. Suppressor of cytokine signaling-3 antagonizes cAMP effects on proliferation and apoptosis and is expressed in human prostate cancer. *The American Journal of Pathology*, 169 (6):2199-2208.
- Bernhard J, Villinger PM. 2001. Rheumatoide Arthritis: Pathogenese und Pathologie. *Schweiz Med Forum* 8:179-183.
- Bixel K, Saini U, Kumar Bid H, Fowler J, Riley M, Wanner R, Deepa Priya Dorayappan K, Rajendran S, Konishi I, Matsumura N, Cohn DE, Selvendiran K. 2017. Targeting STAT3 by HO3867 induces apoptosis in ovarian clear cell carcinoma. *Int J Cancer*, 141 (9):1856-1866.
- Blanco FJ, Moricke R, Dokoupilova E, Codding C, Neal J, Andersson M, Rohrer S, Richards H. 2017. Secukinumab in active rheumatoid arthritis: a phase III randomized, double-blind, active comparator- and placebo-controlled study. *Arthritis Rheumatol*, 69 (6):1144-1153.
- Cassatella MA, Gasperini S, Bovolenta C, Calzetti F, Vollebregt M, Scapini P, Marchi M, Suzuki R, Suzuki A, Yoshimura A. 1999. Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood*, 94 (8):2880-2889.
- Chaves de Souza JA, Nogueira AVB, Chaves de Souza PP, Kim YJ, Silva Lobo C, Pimentel Lopes de Oliveira GJ, Cirelli JA, Garlet GP, Rossa C. 2013. SOCS3 expression correlates with severity of inflammation, expression of proinflammatory cytokines, and activation of STAT3 and p38 MAPK in LPS-induced inflammation in vivo. *Mediators of Inflammation*, 2013:10.
- Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu XY. 1997. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol*, 17 (9):5328-5337.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. 1997a. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 278 (5344):1803-1805.
- Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J. 1997b. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 17 (11):6508.
- Clark W, Jobanputra P, Barton P, Burls A. 2004. The clinical and cost-effectiveness of anakinra for the treatment of rheumatoid arthritis in adults: a systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess*, 8 (18):iii-iv, ix-x, 1-105.

- Costa-Pereira AP, Tininini S, Strobl B, Alonzi T, Schlaak JF, Is'harc H, Gesualdo I, Newman SJ, Kerr IM, Poli V. 2002. Mutational switch of an IL-6 response to an interferon-gamma-like response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (12):8043-8047.
- Crocker BA, Krebs DL, Zhang JG, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, Robb L, Greenhalgh CJ, Forster I, Clausen BE, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Roberts AW, Alexander WS. 2003. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol*, 4 (6):540-545.
- de Hooge AS, van de Loo FA, Koenders MI, Bennink MB, Arntz OJ, Kolbe T, van den Berg WB. 2004. Local activation of STAT-1 and STAT-3 in the inflamed synovium during zymosan-induced arthritis: exacerbation of joint inflammation in STAT-1 gene-knockout mice. *Arthritis Rheum*, 50 (6):2014-2023.
- Devlin RD, Reddy SV, Savino R, Ciliberto G, Roodman GD. 1998. IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)2D3, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13 (3):393-399.
- Dominguez E, Mauborgne A, Mallet J, Desclaux M, Pohl M. 2010. SOCS3-mediated blockade of JAK/STAT3 signaling pathway reveals its major contribution to spinal cord neuroinflammation and mechanical allodynia after peripheral nerve injury. *J Neurosci*, 30 (16):5754-5766.
- Donnerer J, Liebmann I. 2011. A fluorescence-immunohistochemical study on phosphorylation of ERK1/2, p38, and STAT3 in rat dorsal root ganglia following noxious stimulation of hind paw sensory neurons. *Tissue Cell*, 43 (3):178-189.
- Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. 2006. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*, 6 (11):836-848.
- Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, Thomassin N, Rosenzweig S, Harris J, Holland SM, Schreiber RD, Casanova JL. 2001. Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science*, 293 (5528):300-303.
- Ebbinghaus M, Segond von Banchet G, Massier J, Gajda M, Brauer R, Kress M, Schaible HG. 2015. Interleukin-6-dependent influence of nociceptive sensory neurons on antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 17:334.
- Ebbinghaus M, Natura G, Segond von Banchet G, Hensellek S, Bottcher M, Hoffmann B, Salah FS, Gajda M, Kamradt T, Schaible HG. 2017. Interleukin-17A is involved in mechanical hyperalgesia but not in the severity of murine antigen-induced arthritis. *Sci Rep*, 7 (1):10334.
- Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpour S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjostedt E, Lundberg E, Szigartyo CA, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, von Feilitzen K, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlen M. 2014. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 13 (2):397-406.
- Flanagan SE, Haapaniemi E, Russell MA, Caswell R, Allen HL, De Franco E, McDonald TJ, Rajala H, Ramelius A, Barton J, Heiskanen K, Heiskanen-Kosma T, Kajosaari M, Murphy NP, Milenkovic T, Seppanen M, Lernmark A, Mustjoki S, Otonkoski T, Kere J, Morgan NG, Ellard S, Hattersley AT. 2014. Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nat Genet*, 46 (8):812-814.
- Freeman AF, Holland SM. 2008. The hyper-IgE syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am*, 28 (2):277-291.
- Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. 2010. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 6:232.
- Gu FM, Li QL, Gao Q, Jiang JH, Zhu K, Huang XY, Pan JF, Yan J, Hu JH, Wang Z, Dai Z, Fan J, Zhou J. 2011. IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*, 10:150.
- Guan YY, Zhang Y, Liu LX, Li HD, Xue D, Bao WL, Ye G, Shen X. 2018. Suppressive effects of WangBi Tablet on adjuvant-induced arthritis in rats via NFkappaB and STAT3 signaling pathways. *Int J Mol Med*, 42 (3):1666-1674.
- Harper AA, Lawson SN. 1985. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *The Journal of Physiology*, 359 (1):31-46.
- Hata K, Andoh A, Shimada M, Fujino S, Bamba S, Araki Y, Okuno T, Fujiyama Y, Bamba T. 2002. IL-17 stimulates inflammatory responses via NF-kappaB and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282 (6):G1035-1044.
- Heiberg T, Kvien TK. 2002. Preferences for improved health examined in 1,024 patients with rheumatoid arthritis: pain has highest priority. *Arthritis Rheum*, 47 (4):391-397.
- Herold G. 2016. *Innere Medizin 2016*. Köln: Herold, Gerd, 665.

- Herrera-Molina R, Flores B, Orellana JA, von Bernhardt R. 2012. Modulation of interferon-gamma-induced glial cell activation by transforming growth factor beta1: a role for STAT1 and MAPK pathways. *J Neurochem*, 123 (1):113-123.
- Hickman-Brecks CL, Racz JL, Meyer DM, LaBranche TP, Allen PM. 2011. Th17 cells can provide B cell help in autoantibody induced arthritis. *J Autoimmun*, 36 (1):65-75.
- Hirahara K, Onodera A, Villarino AV, Bonelli M, Sciume G, Laurence A, Sun HW, Brooks SR, Vahedi G, Shih HY, Gutierrez-Cruz G, Iwata S, Suzuki R, Mikami Y, Okamoto Y, Nakayama T, Holland SM, Hunter CA, Kanno Y, O'Shea JJ. 2015. Asymmetric action of STAT transcription factors drives transcriptional outputs and cytokine specificity. *Immunity*, 42 (5):877-889.
- Holzer P. 1991. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews*, 43 (2):143.
- Hong F, Jaruga B, Kim WH, Radaeva S, El-Assal ON, Tian Z, Nguyen VA, Gao B. 2002. Opposing roles of STAT1 and STAT3 in T cell-mediated hepatitis: regulation by SOCS. *J Clin Invest*, 110 (10):1503-1513.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. 1981. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*, 75 (6):816-821.
- Hunter CA. 2007. Act1-ivating IL-17 inflammation. *Nature Immunology*, 8:232.
- Hunter CA, Jones SA. 2015. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, 16:448.
- Huscher D, Mittendorf T, von Hinuber U, Kotter I, Hoese G, Pfafflin A, Bischoff S, Zink A, German Collaborative Arthritis C. 2015. Evolution of cost structures in rheumatoid arthritis over the past decade. *Ann Rheum Dis*, 74 (4):738-745.
- Irmiler IM, Gajda M, Brauer R. 2007. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. *J Immunol*, 179 (9):6228-6236.
- Ivashkiv LB, Hu X. 2003. The JAK/STAT pathway in rheumatoid arthritis: pathogenic or protective? *Arthritis Rheum*, 48 (8):2092-2096.
- Jackson NM, Ceresa BP. 2017. EGFR-mediated apoptosis via STAT3. *Exp Cell Res*, 356 (1):93-103.
- Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*, 160 (7):3513-3521.
- Kamel KM, Gad AM, Mansour SM, Safar MM, Fawzy HM. 2018. Novel anti-arthritis mechanisms of polydatin in complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats: involvement of IL-6, STAT-3, IL-17, and NF-κB. *Inflammation*, 41 (5):1974-1986.
- Kasperkovitz PV, Verbeet NL, Smeets TJ, van Rietschoten JG, Kraan MC, van der Pouw Kraan TC, Tak PP, Verweij CL. 2004. Activation of the STAT1 pathway in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 63 (3):233-239.
- Khodarev NN, Beckett M, Labay E, Darga T, Roizman B, Weichselbaum RR. 2004. STAT1 is overexpressed in tumors selected for radioresistance and confers protection from radiation in transduced sensitive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (6):1714-1719.
- Kim HS, Kim DC, Kim HM, Kwon HJ, Kwon SJ, Kang SJ, Kim SC, Choi GE. 2015. STAT1 deficiency redirects IFN signalling toward suppression of TLR response through a feedback activation of STAT3. *Sci Rep*, 5:13414.
- Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS, Shnier R, Portek IJ. 2006. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum*, 54 (4):1122-1131.
- Lang R, Pauleau A-L, Parganas E, Takahashi Y, Mages J, Ihle JN, Rutschman R, Murray PJ. 2003. SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nature Immunology*, 4:546.
- Larsen L, Ropke C. 2002. Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *APMIS*, 110 (12):833-844.
- Lee H, Herrmann A, Deng JH, Kujawski M, Niu G, Li Z, Forman S, Jove R, Pardoll DM, Yu H. 2009. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell*, 15 (4):283-293.
- Lee YC, Nassikas NJ, Clauw DJ. 2011. The role of the central nervous system in the generation and maintenance of chronic pain in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and fibromyalgia. *Arthritis Res Ther*, 13 (2):211.
- Li W, Lee MR, Kim T, Kim YW, Cho MY. 2018. Activated STAT3 may participate in tumor progression through increasing CD133/survivin expression in early stage of colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 497 (1):354-361.

- Li X, Leung S, Qureshi S, Darnell JE, Jr., Stark GR. 1996. Formation of STAT1-STAT2 heterodimers and their role in the activation of IRF-1 gene transcription by interferon- α . *J Biol Chem*, 271 (10):5790-5794.
- Li YY, Li H, Liu ZL, Li Q, Qiu HW, Zeng LJ, Yang W, Zhang XZ, Li ZY. 2017. Activation of STAT3-mediated CXCL12 up-regulation in the dorsal root ganglion contributes to oxaliplatin-induced chronic pain. *Mol Pain*, 13:1744806917747425.
- Liongue C, Ward AC. 2013. Evolution of the JAK-STAT pathway. *JAKSTAT*, 2 (1):e22756.
- Liu C, Qian W, Qian Y, Giltiay NV, Lu Y, Swaidani S, Misra S, Deng L, Chen ZJ, Li X. 2009. Act1, a U-box E3 ubiquitin ligase for IL-17 signaling. *Science signaling*, 2 (92):ra63-ra63.
- Lubberts E, Joosten LA, van de Loo FA, Schwarzenberger P, Kolls J, van den Berg WB. 2002. Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction. *Inflamm Res*, 51 (2):102-104.
- Ma M, Huang W, Kong D. 2018. IL-17 inhibits the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer via activating STAT3. *Int Immunopharmacol*, 59:148-156.
- Ma Q-P. 2002. Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats. *Neuroscience Letters*, 319 (2):87-90.
- Mageed RA, Borretzen M, Moyes SP, Thompson KM, Natvig JB. 1997. Rheumatoid factor autoantibodies in health and disease. *Ann N Y Acad Sci*, 815:296-311.
- Mandal M, Powers SE, Maienschein-Cline M, Bartom ET, Hamel KM, Kee BL, Dinner AR, Clark MR. 2011. Epigenetic repression of the Igk locus by STAT5-mediated recruitment of the histone methyltransferase Ezh2. *Nat Immunol*, 12 (12):1212-1220.
- Mao X, Ren Z, Parker GN, Sondermann H, Pastorello MA, Wang W, McMurray JS, Demeler B, Darnell JE, Jr., Chen X. 2005. Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol Cell*, 17 (6):761-771.
- McCleskey EW, Gold MS. 1999. Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol*, 61:835-856.
- Miehle W. 1999. *Rheumatoide Arthritis*. 2. Auflage Aufl. Stuttgart: Thieme, 7-8.
- Minnock P, FitzGerald O, Bresnihan B. 2003. Women with established rheumatoid arthritis perceive pain as the predominant impairment of health status. *Rheumatology (Oxford)*, 42 (8):995-1000.
- Neugebauer V, Lucke T, Schaible HG. 1993. N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists block the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. *J Neurophysiol*, 70 (4):1365-1377.
- Neumann H, Schmidt H, Wilharm E, Behrens L, Wekerle H. 1997. Interferon gamma gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation. *J Exp Med*, 186 (12):2023-2031.
- Ouchi T, Lee SW, Ouchi M, Aaronson SA, Horvath CM. 2000. Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN- γ target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (10):5208-5213.
- Page CE, Smale S, Carty SM, Amos N, Lauder SN, Goodfellow RM, Richards PJ, Jones SA, Topley N, Williams AS. 2010. Interferon- γ inhibits interleukin-1 β -induced matrix metalloproteinase production by synovial fibroblasts and protects articular cartilage in early arthritis. *Arthritis Res Ther*, 12 (2):R49.
- Park JS, Lee J, Lim MA, Kim EK, Kim SM, Ryu JG, Lee JH, Kwok SK, Park KS, Kim HY, Park SH, Cho ML. 2014. JAK2-STAT3 blockade by AG490 suppresses autoimmune arthritis in mice via reciprocal regulation of regulatory T Cells and Th17 cells. *J Immunol*, 192 (9):4417-4424.
- Paulin F, Mercado JF, Fernandez ME, Caro FM, Alberti ML, Fassola LA. 2018. Correlation between lung and joint involvement in patients with rheumatoid arthritis and interstitial lung disease: a cross-sectional study. *Rev Invest Clin*, 70 (2):76-81.
- Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Kastelein RA. 2004. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol*, 172 (4):2225-2231.
- Pinho-Ribeiro FA, Verri WA, Jr., Chiu IM. 2017. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. *Trends Immunol*, 38 (1):5-19.
- Qing Y, Stark GR. 2004. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon- γ . *J Biol Chem*, 279 (40):41679-41685.
- Racz I, Nadal X, Alferink J, Banos JE, Rehnelt J, Martin M, Pintado B, Gutierrez-Adan A, Sanguino E, Bellora N, Manzanares J, Zimmer A, Maldonado R. 2008. Interferon- γ is a critical modulator of CB(2) cannabinoid receptor signaling during neuropathic pain. *J Neurosci*, 28 (46):12136-12145.
- Richter F, Natura G, Ebbinghaus M, Segond von Banchet GS, Hensellek S, Konig C, Brauer R, Schaible HG. 2012. Interleukin-17 sensitizes joint nociceptors to mechanical stimuli and contributes to

- arthritic pain through neuronal interleukin-17 receptors in rodents. *Arthritis Rheum*, 64 (12):4125-4134.
- Rickardson L, Fryknas M, Dhar S, Lovborg H, Gullbo J, Rydaker M, Nygren P, Gustafsson MG, Larsson R, Isaksson A. 2005. Identification of molecular mechanisms for cellular drug resistance by combining drug activity and gene expression profiles. *Br J Cancer*, 93 (4):483-492.
- Schaible H-G, Grubb BD. 1993. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*, 55 (1):5-54.
- Schaible H-G, Richter F, Ebersberger A, Boettger MK, Vanegas H, Natura G, Vazquez E, Segond von Banchet G. 2009. Joint pain. *Experimental Brain Research*, 196 (1):153-162.
- Schaible HG, Schmidt RF. 1988. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *Journal of Neurophysiology*, 60 (6):2180-2195.
- Schaible HG, Ebersberger A, Segond von Banchet GS. 2002. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, 966:343-354.
- Schaible HG, Segond von Banchet GS, Boettger MK, Brauer R, Gajda M, Richter F, Hensellek S, Brenn D, Natura G. 2010. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann N Y Acad Sci*, 1193:60-69.
- Segond von Banchet G, Boettger MK, Konig C, Iwakura Y, Brauer R, Schaible HG. 2013. Neuronal IL-17 receptor upregulates TRPV4 but not TRPV1 receptors in DRG neurons and mediates mechanical but not thermal hyperalgesia. *Mol Cell Neurosci*, 52:152-160.
- Segond von Banchet G, Konig C, Patzer J, Eitner A, Leuchtweis J, Ebbinghaus M, Boettger MK, Schaible HG. 2016. Long-lasting activation of the transcription factor CREB in sensory neurons by interleukin-1 β during antigen-induced arthritis in rats: a mechanism of persistent arthritis pain? *Arthritis Rheumatol*, 68 (2):532-541.
- Shen Y, Li D, Li B, Xi P, Zhang Y, Jiang Y, Xu Y, Chen H, Xiong Y. 2018. Up-regulation of CX3CL1 via STAT3 contributes to SMIR-induced chronic postsurgical pain. *Neurochem Res*, 43 (3):556-565.
- Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, Yoshimura A. 2001. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *The Journal of clinical investigation*, 108 (12):1781-1788.
- Sommer C, Kress M. 2004. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*, 361 (1-3):184-187.
- Song Z, Xiong B, Zheng H, Manyande A, Guan X, Cao F, Ren L, Zhou Y, Ye D, Tian Y. 2017. STAT1 as a downstream mediator of ERK signaling contributes to bone cancer pain by regulating MHC II expression in spinal microglia. *Brain Behav Immun*, 60:161-173.
- Stark GR, Darnell JE, Jr. 2012. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*, 36 (4):503-514.
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJL, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387:917.
- Stephanou A, Brar BK, Knight RA, Latchman DS. 2000. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death Differ*, 7 (3):329-330.
- Stromberg H, Svensson SP, Hermanson O. 2000. Distribution of the transcription factor signal transducer and activator of transcription 3 in the rat central nervous system and dorsal root ganglia. *Brain Res*, 853 (1):105-114.
- Sweitzer SM, White KA, Dutta C, DeLeo JA. 2002. The differential role of spinal MHC class II and cellular adhesion molecules in peripheral inflammatory versus neuropathic pain in rodents. *J Neuroimmunol*, 125 (1-2):82-93.
- Taylor PC, Keystone EC, van der Heijde D, Weinblatt ME, Del Carmen Morales L, Reyes Gonzaga J, Yakushin S, Ishii T, Emoto K, Beattie S, Arora V, Gaich C, Rooney T, Schlichting D, Macias WL, de Bono S, Tanaka Y. 2017. Baricitinib versus placebo or Adalimumab in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 376 (7):652-662.
- Tong M, Wang J, Jiang N, Pan H, Li D. 2017. Correlation between p-STAT3 overexpression and prognosis in lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 12 (8):e0182282.
- Tsuda M, Masuda T, Kitano J, Shimoyama H, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. 2009. IFN- γ receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (19):8032-8037.
- Uson J, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Cabezas JA, Gonzalez-Tarrio JM, Martin-Mola E, Fontan G. 1997. Soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6 levels in serum and synovial fluid of patients with different arthropathies. *J Rheumatol*, 24 (11):2069-2075.
- van Baarsen LGM, Lebre MC, van der Coelen D, Aarass S, Tang MW, Ramwadhoebe TH, Gerlag DM, Tak PP. 2014. Heterogeneous expression pattern of interleukin 17A (IL-17A), IL-17F and

- their receptors in synovium of rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis: possible explanation for nonresponse to anti-IL-17 therapy? *Arthritis research & therapy*, 16 (4):426-426.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death And Differentiation*, 10:45.
- Walker JG, Ahern MJ, Coleman M, Weedon H, Papangelis V, Beroukas D, Roberts-Thomson PJ, Smith MD. 2006. Expression of Jak3, STAT1, STAT4, and STAT6 in inflammatory arthritis: unique Jak3 and STAT4 expression in dendritic cells in seropositive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 65 (2):149-156.
- Wan CK, Andraski AB, Spolski R, Li P, Kazemian M, Oh J, Samsel L, Swanson PA, 2nd, McGavern DB, Sampaio EP, Freeman AF, Milner JD, Holland SM, Leonard WJ. 2015. Opposing roles of STAT1 and STAT3 in IL-21 function in CD4⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 (30):9394-9399.
- Wang L, Kurosaki T, Corey SJ. 2006. Engagement of the B-cell antigen receptor activates STAT through Lyn in a Jak-independent pathway. *Oncogene*, 26:2851.
- Wang W, Yin Y, Xu L, Su J, Huang F, Wang Y, Boor PPC, Chen K, Wang W, Cao W, Zhou X, Liu P, van der Laan LJW, Kwekkeboom J, Peppelenbosch MP, Pan Q. 2017. Unphosphorylated ISGF3 drives constitutive expression of interferon-stimulated genes to protect against viral infections. *Sci Signal*, 10 (476).
- Wang ZF, Li Q, Liu SB, Mi WL, Hu S, Zhao J, Tian Y, Mao-Ying QL, Jiang JW, Ma HJ, Wang YQ, Wu GC. 2014. Aspirin-triggered Lipoxin A4 attenuates mechanical allodynia in association with inhibiting spinal JAK2/STAT3 signaling in neuropathic pain in rats. *Neuroscience*, 273:65-78.
- Whitmarsh RJ, Gray CM, Gregg B, Christian DA, May MJ, Murray PJ, Hunter CA. 2011. A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe*, 10 (3):224-236.
- Xue ZJ, Shen L, Wang ZY, Hui SY, Huang YG, Ma C. 2014. STAT3 inhibitor WP1066 as a novel therapeutic agent for bCCI neuropathic pain rats. *Brain Res*, 1583:79-88.
- Yam MF, Loh YC, Tan CS, Khadijah Adam S, Abdul Manan N, Basir R. 2018. General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *Int J Mol Sci*, 19 (8).
- Yamauchi K, Osuka K, Takayasu M, Usuda N, Nakazawa A, Nakahara N, Yoshida M, Aoshima C, Hara M, Yoshida J. 2006. Activation of JAK/STAT signalling in neurons following spinal cord injury in mice. *J Neurochem*, 96 (4):1060-1070.
- Yin Y, Liu W, Dai Y. 2015. SOCS3 and its role in associated diseases. *Human Immunology*, 76 (10):775-780.
- Yu T, Zuo Y, Cai R, Huang X, Wu S, Zhang C, Chin YE, Li D, Zhang Z, Xia N, Wang Q, Shen H, Yao X, Zhang ZY, Xue S, Shen L, Cheng J. 2017. SENP1 regulates IFN-gamma-STAT1 signaling through STAT3-SOCS3 negative feedback loop. *J Mol Cell Biol*, 9 (2):144-153.
- Zhang CY, Shao FR, Cai RL, Yuan J, Yin G, Tang ZL. 2015. Effects of Moxibustion on expression of STAT 1, SOCS mRNA in synovium of rats with rheumatoid arthritis. *Zhen Ci Yan Jiu*, 40 (3):205-209.
- Zhang JJ, Vinkemeier U, Gu W, Chakravarti D, Horvath CM, Darnell JE, Jr. 1996. Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (26):15092-15096.
- Zhang Y, Siegel AM, Sun G, Dimaggio T, Freeman AF, Milner JD. 2018. Human TH9 differentiation is dependent on signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 to restrain STAT1-mediated inhibition. *J Allergy Clin Immunol*.
- Zhao LJ, He SF, Liu Y, Zhao P, Bian ZQ, Qi ZT. 2016. Inhibition of STAT pathway impairs anti-hepatitis C virus effect of interferon alpha. *Cell Physiol Biochem*, 40 (1-2):77-90.
- Zheng Y, Wang Z, Deng L, Zhang G, Yuan X, Huang L, Xu W, Shen L. 2015. Modulation of STAT3 and STAT5 activity rectifies the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol*, 157 (1):65-77.
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 264 (5155):95-98.

9 Anhang

9.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung einer nozizeptiven Endigung.	12
Abbildung 2 JAK-STAT-Signalweg. Key elements of the JAK-STAT pathway, Peter Znamenkiy, 1.Juli 2006, Eigenes Werk, All right released, donated to public domain, URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Jakstat_pathway.svg?uselang=de#/media/File:Jakstat_pathway.svg , 19.03.2019	15
Abbildung 3 Interaktionen zwischen STAT1 und STAT3.	21
Abbildung 4 Stimulationsschema	29
Abbildung 5 Systematisches Fotografieren des Präparats	32
Abbildung 6 DRG-Neurone nach pSTAT3-Markierung in der Fluoreszenz-mikroskopie.	32
Abbildung 7 IL-17A und pSTAT3 in der Fluoreszenzmikroskopie.	34
Abbildung 8 pSTAT3-Expression nach IL-17A-Stimulation.	35
Abbildung 9 pSTAT3-Dynamik nach IL-17A-Stimulation.	36
Abbildung 10 pSTAT1 im zeitlichen Verlauf der AIA.	38
Abbildung 11 pSTAT1 im zeitlichen Verlauf der AIA.	39
Abbildung 12 Paraffinschnitte von Spinalganglien nach AIA.	40
Abbildung 13 SOCS3 nach IFN-γ-Stimulation (Hungerperiode 3-4 Stunden).	42
Abbildung 14 SOCS3 nach IFN-γ-Stimulation (Hungerperiode 48 Stunden).	43
Abbildung 15 SOCS3 nach kombinierter Stimulation (Hungerperiode 48 Stunden).	44
Abbildung 16 Grauwerte nach IFN-γ Stimulation.	45
Abbildung 17 Vergleich Hintergrundfluoreszenz und Kontrolle Sekundärantikörper.	46
Abbildung 18 Grauwerte der Kontrollen ohne Primärantikörper.	47
Abbildung 19 SOCS3-Markierung nach IFN-γ-Stimulation und Kontrolle.	47
Abbildung 20 SOCS3 nach IFN-γ-Stimulation.	48
Abbildung 21 Mittlerer Grauwert SOCS3-positiver Neurone.	49
Abbildung 22 Größenverteilung der SOCS3-positiven DRG-Neurone.	50
Abbildung 23 Größenverteilung SOCS3-positiver DRG-Neurone.	51
Abbildung 24 pSTAT3 nach IFN-γ-Stimulation.	52
Abbildung 25 pSTAT3 und IFN-γ im Western Blot.	53
Abbildung 26 pSTAT3, IFN-γ und IL-6 im Western Blot.	54
Abbildung 27 Ergebnisdarstellung	56
Abbildung 28 Überlegungen zu pSTAT1 und pSTAT3 in der AIA.	63
Tabelle 1 Geräte	23
Tabelle 2 Kulturmedien, Puffer und Reagenzien	25
Tabelle 3 Zytokine und Antikörper	26
Tabelle 4 Zytokine	28
Tabelle 5 Größenverteilung SOCS3-positiver DRG-Neurone	49

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. Gisela Segond von Banchet, Dr. Christian König, Prof. Dr. Frank Richter und Prof. Dr. Hans-Georg Schaible,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Bad Köstritz, 15.06.2020

Ort, Datum



Unterschrift des Verfassers

9.3 Danksagung

Ich danke meiner Doktormutter PD Dr. Gisela Segond von Banchet für die engagierte Betreuung. Sie half mir bei der Themenfindung. Wenn experimentelle oder inhaltliche Rückschläge auftraten, gab sie mir wertvolle Hinweise. Auch danke ich meinem Zweitbetreuer Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Schaible für seine Einschätzung und die weiteren Anregungen bezüglich dieser Arbeit.

Dr. Christian König und Prof. Dr. Frank Richter möchte ich ebenfalls für die bereitwillige Beantwortung meiner Fragen und die Einbeziehung weiterer Daten danken. Während der Laborarbeit gaben mir die medizinisch-technischen Assistentinnen Antje Wallner, Jana Struppert und die Ingenieurin Konstanze Ernst hilfreiche Anleitung und Unterstützung.

Meine liebe Ehefrau Miriam Götze unterstützte und motivierte mich nach experimentellen Fehlschlägen und während des Schreibens. Auch danke ich meinen Eltern für die finanzielle und emotionale Unterstützung, die mir ein Freisemester zur Fertigstellung dieser Promotionsschrift ermöglichte.